

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANE HENNEBERG

EFICIÊNCIA DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE  
*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary EM SEMENTES DE SOJA

CURITIBA – PR

2011

LUCIANE HENNEBERG

EFICIÊNCIA DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE  
*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary EM SEMENTES DE SOJA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências Agrárias.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maristela Panobianco

Co-orientador: Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

CURITIBA

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO, apresentada pela candidata **LUCIANE HENNEBERG**, sob o título **"EFICIÊNCIA DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DE BARY EM SEMENTES DE SOJA"**, para obtenção do grau de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido o candidato são de parecer pela **"APROVAÇÃO"** da Tese.

Curitiba, 15 de Dezembro de 2011.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio  
Coordenadora do Programa

Professora Dra. Maria Heloisa Duarte de Moraes  
Primeira Examinadora

Professor Dr. David de Souza Jaccoud Filho  
Segundo Examinador

Professor Dr. Alvaro Figueredo dos Santos  
Terceiro Examinador

Professora Dra. Lucimeris Ruaro  
Quarta Examinadora

Professora Dra. Maristela Panobianco  
Presidente da Banca e Orientadora

*Dedico todo o conhecimento  
adquirido a Jesus Cristo, no qual  
encontro a sabedoria*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, no qual eu reconheço minha dependência.

Aos meus pais João Henrique e Rute, a minha mãe de criação Eza (*in memoriam*) e minha avó Nair (*in memoriam*), pelo exemplo de determinação, amor e fé.

Aos meus amados irmãos Élio, Alcione, Henrique, Liana, Herivelto, Simone, Railson, Andressa e Dione; meus sobrinhos Matheus, Kamila, Lucas, Rodolfo, Luiza, Ana, Rebecca, Isabel e Joãozinho; minha família é o meu aconchego.

A minha querida orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maristela Panobianco, por ter acreditado em meu sonho, pelas horas que cedeu para me ensinar e pela paciência.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. David. de Souza Jaccoud Filho, pelo exemplo de integridade e liderança, além de sempre me incentivar para seguir em frente, bem como a sua esposa Julieta, pois é verdadeira a frase “ao lado de um grande homem existe uma grande mulher”.

Aos meus amigos de anos de trabalho na UEPG, Zima, Dirce, Verônica, Nilcéia, Marcinha, César, Eunice, Lúcia, Ana, Edite, Clarice, Jaqueline, Tânia, Gilmar, as telefonistas, os vigilantes, as meninas do Restaurante Universitário e aos demais amigos que sempre torcem pelo meu sucesso e me ajudam a alcançá-lo.

Aos meus amigos, tão jovens, mas tão determinados, Edilaine, Cláudio, Miguel, Marcelo, Airton, José Marcelo, Mateus, Felipe, Lucas, Guilherme, Hamilton, Camila, Rubiane, Daniele, Janaína, Fernanda, Baram pela alegria de viver que vocês me passam e sempre dispostos a ajudar; tenho certeza que serão grandes profissionais.

A minha líder Kellen e minhas amigas de célula Kairos; pelas orações e ao amor de Deus que nos une.

Ao meu pastor Nelson Braidó e toda a equipe de pastores da Igreja Cristã Presbiteriana pelas palavras proféticas.

As minhas discípulas Viviane, Josefa, Terezinha, Cleri, Célia, Luciane e Andressa que com a convivência nos tornamos confidentes de momentos difíceis e alegres; mas acima de tudo, confiantes que em Deus podemos sonhar.

Aos professores do Curso de Agronomia da UEPG pelo apoio e incentivo, principalmente ao Prof. Jefferson Zagonel e Prof<sup>a</sup> Maristella Dalla Pria.

Aos amigos da UFPR Camila, Tereza Cristina, Rosemeire, Nogueira, Bruna, Sibelle, Roseli, Cléia, Virginia, Seu Zézinho, Dona Valnete que me fizeram sentir em casa e pelo apoio nos trabalhos.

A secretária do PGAPV Lucimara Antunes, pela sua dedicação ao curso e a pela paciência.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucimeris Ruaro, pelo apoio e consideração, obrigada pelo carinho.

Ao Prof. Dr. José da Cruz Machado, Prof. Dr. José Otávio Menten e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Heloísa Duarte de Moraes, pela singeleza que me aconselharam nos momentos de insegurança e por serem exemplos de grandes pesquisadores.

Ao Prof. Dr. Álvaro F. dos Santos, pelas sugestões que acrescentaram o meu conhecimento e a redação da tese.

A Sr. José Bento Azambuja Germano, Sr. Ely de Azambuja Germano Neto, Sr. Ivo Frare, Sr. Antônio Luiz Frarei, Sr. Hérculano, Sr<sup>a</sup> Joelma, Sr. Claudinei, Sr. Júlio, Seu Luís e aos demais funcionários da Fazenda Mutuca; ao Diretor técnico Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Joaquim Mariano Costa e ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> José Ricardo da COAMO, que são grandes incentivadores de pesquisa e pelas refeições e pousos.

Aos produtores: Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> André Giotri e família, seu gerente Orlei; Reinaldo Garmater e seu gerente Eloir; Edimilson Rickler; e ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Carlos Olivetti da Empresa FUTURAGRO e ao Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> José Ariovaldo Sartori da Empresa FORQUÍMICA, pelas áreas cedidas e o incentivo à pesquisa.

Aos funcionários da Biblioteca da UFPR, pela agradável recepção e aos funcionários da Biblioteca da UEPG, que são meus grandes amigos e motivadores.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pelo auxílio financeiro ao Projeto Edital 064/2008.

E a todos que me ajudaram a ser a pessoa que sou hoje, vocês são a bondade de Deus na minha vida.

## RESUMO

O complexo soja (grão, farelo e óleo) contribui significativamente para as exportações do agronegócio brasileiro. Dentre os principais fatores que limitam o rendimento da soja, as doenças são as mais importantes e de mais difícil controle. A maioria dos patógenos de soja é transportada pela semente, merecendo destaque o fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da doença conhecida como Mofo Branco, a qual vem apresentando níveis preocupantes de incidência nos estados produtores de soja. Existem diferentes métodos para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, que necessitam ser aprimorados para uso em análise de rotina de laboratórios. A pesquisa objetivou estudar a eficiência dos principais métodos descritos na literatura para detecção do fungo *S. sclerotiorum* em sementes de soja, comparando sensibilidade, repetibilidade e o efeito de fungos indesejáveis, bem como verificar a influência do nível de infecção do patógeno na semente na sensibilidade dos métodos. Foram realizados experimentos durante três safras agrícolas (entre os anos 2008 e 2011), sendo utilizadas amostras de sementes de soja com diferentes níveis de infecção: a) naturalmente infectadas (oriundas de áreas com o histórico da doença; ou de áreas com a incidência conhecida da doença no campo; ou colhidas diretamente de plantas infectadas); b) artificialmente inoculadas (com incidência conhecida do patógeno). Compararam-se os seguintes métodos de detecção recomendados pela literatura: “Blotter test” a 7 °C, 14 °C e 20 °C; Rolo de Papel e Neon-S. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a sensibilidade dos métodos não possibilitou a detecção do patógeno nas sementes provenientes de áreas com incidência da doença e nem a repetibilidade dos resultados; porém, os métodos foram eficientes para a detecção em sementes inoculadas artificialmente. No método de incubação em “Blotter test” a 7 °C, observou-se menor incidência de outros fungos considerados indesejáveis durante as análises de sementes realizadas. Os níveis de incidência do patógeno *S. sclerotiorum* em sementes de soja interferiram na sensibilidade dos métodos de detecção, não se observando relação entre a incidência no campo do patógeno *S. sclerotiorum* e a verificada na semente de soja colhida. Pelos métodos utilizados constatou-se que as sementes provenientes de plantas de soja infectadas por *S. sclerotiorum* no campo, não necessariamente podem estar transportando o patógeno.

Palavras-chave: *Glycine max.* mofo branco. patologia de sementes.



## ABSTRACT

The soybean complex (grain, meal and oil) contributes significantly to the Brazilian agribusiness exports. Among the main factors limiting the soybean yield, diseases are the most important and most difficult to control. Many of soybean pathogens are transported by seed, earning featured the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, which causes the disease known as white mold, that is presenting worrying incidence levels at soybeans producers states. There are different methods to *S. sclerotiorum* detection in soybean seeds that need to be enhanced for use on routine analysis at laboratories. The present research aimed to verify the efficiency of different methods described in the literature to *S. sclerotiorum* detection on soybean seeds, comparing sensitivity, repeatability, undesirable fungi effect and to verify the seed pathogen infection level influence on methods sensibility. The experiments were performed during three crop seasons (between 2008 and 2011), using soybean seeds samples with different infection levels: a) naturally infected (from areas with disease history, or from areas with known field disease incidence or harvested directly from infected plants); b) artificially contaminated (with known pathogen incidence). The following methods recommended by the literature were compared: Filter Paper ("Blotter test") at 7°C, 14°C and 20°C; Paper Roll and Neon-S. The results obtained showed that the sensitivity of the methods did not allow detection of the pathogen in seed from areas with disease incidence nor the repeatability of results, but were effective for the detection of artificially inoculated seeds; but were effective to pathogen detection on artificially inoculated seeds. On Filter Paper at 7°C incubation method, a lower incidence of other fungi that are considered undesirable during the seeds analysis was observed. The *S. sclerotiorum* incidence levels on soybean seeds had influenced on detection methods sensitivity, and no significant relationship was observed between the field pathogen incidence and the harvested soybean seed incidence. Through the used methods was verified that the seeds from soybean infected plants by *S. sclerotiorum* in the field, may not necessarily be transported by the pathogen.

Key words: *Glycine max.* white mold. seed quality.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>1- INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2 - REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 MOFO BRANCO (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>).....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Etiologia.....	17
2.1.2 Transmissibilidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> pela semente.....	19
<b>2.2 MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Incubação em Substrato de Papel ou método do Papel de Filtro (“Blotter test”).....	21
2.2.2 Incubação em Rolo de Papel.....	23
2.2.3 Incubação em Meio Agar-Bromofenol (Neon).....	23

### **CAPÍTULO 1 - EFICIÊNCIA DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM LOTES DE SEMENTES COMERCIAIS DE SOJA**

<b>RESUMO.....</b>	<b>25</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>26</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>
<b>TABELAS E FIGURAS .....</b>	<b>40</b>

**CAPÍTULO 2 - NÍVEL DE INCIDÊNCIA DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM  
SEMENTES DE SOJA E SUA INFLUÊNCIA NA SENSIBILIDADE DOS  
MÉTODOS DE DETECÇÃO**

<b>RESUMO.....</b>	<b>44</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>45</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>
<b>TABELAS .....</b>	<b>59</b>
<b>3 - CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1 - EFICIÊNCIA DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM LOTES DE SEMENTES COMERCIAIS DE SOJA**

TABELA 1.	COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MÉTODOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE <i>S. sclerotiorum</i> EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SETE CULTIVARES DE SOJA NATURALMENTE INFECTADA E DE UMA AMOSTRA INOCULADA ARTIFICIALMENTE.....	40
TABELA 2.	COMPARAÇÃO DA REPETIBILIDADE DE MÉTODOS UTILIZADOS NA DETECÇÃO DE <i>S. sclerotiorum</i> EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SETE CULTIVARES DE SOJA NATURALMENTE INFECTADA E DE UMA AMOSTRA INOCULADA ARTIFICIALMENTE.....	41

### **CAPÍTULO 2 - NÍVEL DE INCIDÊNCIA DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SEMENTES DE SOJA E SUA INFLUÊNCIA NA SENSIBILIDADE DOS TESTES DE DETECÇÃO**

TABELA 1.	SENSIBILIDADE DOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA DETECÇÃO DE <i>S. sclerotiorum</i> EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SOJA INOCULADAS ARTIFICIALMENTE, COM INCIDÊNCIAS CONHECIDAS DO PATÓGENO (SAFRA 2008/09).....	59
TABELA 2.	SENSIBILIDADE DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>S. sclerotiorum</i> EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SEIS CULTIVARES DE SOJA, ORIUNDAS DE ÁREAS NAS QUAIS FOI ACOMPANHADA A INCIDÊNCIA NO CAMPO DA DOENÇA (SAFRA 2009/10).....	60

TABELA 3.	SENSIBILIDADE DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE <i>S. sclerotiorum</i> EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SOJA, COLHIDAS DIRETAMENTE DE PLANTAS INFECTADAS (SAFRAS 2009/10 E 2010/11).....	61
-----------	---	----

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	SINTOMAS E SINAIS DO FUNGO <i>S. sclerotiorum</i> EM PLANTA DE SOJA: A) ENCHARCAMENTO DO LIMBO FOLIAR NA FOLHA; (B) LESÕES E FORMAÇÃO DE MICÉLIO BRANCO NA HASTE; (C) FORMAÇÃO DE MICÉLIO BRANCO E ESCLERÓDIOS EM HASTE E VAGENS.....	17
-----------	---	----

### **CAPÍTULO 1 - EFICIÊNCIA DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM LOTES DE SEMENTES COMERCIAIS DE SOJA**

FIGURA 1.	INCIDÊNCIA (Nº) DE SEMENTES COM A PRESENÇA DE OUTROS FUNGOS OBSERVADA NO MÉTODO “ <i>Blotter test</i> ” A 7 °C, EM RELAÇÃO AOS DIAS DE INCUBAÇÃO EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SOJA, ORIUNDAS DE ÁREAS NATURALMENTE INFESTADAS E EM UMA AMOSTRA INOCULADA ARTIFICIALMENTE POR <i>S. sclerotiorum</i> .....	42
FIGURA 2.	INCIDÊNCIA (Nº) DE SEMENTES COM A PRESENÇA DE OUTROS FUNGOS OBSERVADA NO MÉTODO “ <i>Blotter test</i> ” A 14 °C, EM RELAÇÃO AOS DIAS DE INCUBAÇÃO EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SOJA, ORIUNDAS DE ÁREAS NATURALMENTE INFESTADAS E EM UMA AMOSTRA INOCULADA ARTIFICIALMENTE POR <i>S. sclerotiorum</i> .....	42
FIGURA 3.	INCIDÊNCIA (Nº) DE SEMENTES COM A PRESENÇA DE OUTROS FUNGOS OBSERVADA NO MÉTODO “ <i>Blotter test</i> ” A 20 °C, EM RELAÇÃO AOS DIAS DE INCUBAÇÃO EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SOJA, ORIUNDAS DE ÁREAS NATURALMENTE INFESTADAS E EM UMA AMOSTRA INOCULADA ARTIFICIALMENTE POR <i>S. sclerotiorum</i> .....	43

FIGURA 4.	INCIDÊNCIA (Nº) DE SEMENTES COM A PRESENÇA DE OUTROS FUNGOS OBSERVADA NO MÉTODO NEON A 20 °C, EM RELAÇÃO AOS DIAS DE INCUBAÇÃO EM AMOSTRAS DE SEMENTES DE SOJA, ORIUNDAS DE ÁREAS NATURALMENTE INFESTADAS E EM UMA AMOSTRA INOCULADA ARTIFICIALMENTE POR <i>S. sclerotiorum</i> .....	43
-----------	---	----

## 1 - INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o segundo maior produtor de soja (*Glycine max* L. Merrill), respondendo por cerca de 20 % da produção mundial. A expansão do cultivo dessa oleaginosa nos últimos anos é crescente, sendo estimado um incremento de 611 mil hectares para safra 2011/12. O Paraná ocupa a segunda posição nacional, correspondendo a 19 % da produção de grãos (EMBRAPA, 2010; CONAB, 2011).

O complexo soja (grão, farelo e óleo) é um dos principais setores que contribuem significativamente para as exportações do agronegócio brasileiro, colaborando com o acréscimo do superávit do país, tanto pelo aumento de preços no mercado externo quanto pelo incremento da quantidade exportada (PAULA e FAVERET FILHO, 2009; BRASIL, 2011).

A semente é considerada o mais importante insumo agrícola, tendo duas funções principais: multiplicação de plantas e material utilizado para comercialização de grãos (consumo humano e animal). As sementes se diferenciam dos grãos pela sua qualidade, determinada por um conjunto de atributos de natureza genética, física, fisiológica e sanitária (MARCOS FILHO, 2005). O aumento da qualidade da semente é responsável pelo aumento significativo da produtividade.

O fator sanitário, por meio do controle de doenças transmissíveis pela semente, é relevante na produção agrícola, uma vez que não se refere somente ao dano causado na semente, mas também a própria expressão econômica de cada doença (MENTEN, 1995). Neste sentido, Jaccoud-Filho et al. (2002) observaram perda econômica significativa na cultura de soja causada por fungos de solo provenientes da semente.

Os danos decorrentes da associação patógeno/semente resultam na diminuição da emergência de plântulas e da produtividade, podendo causar prejuízos para todo o sistema agrícola com a disseminação de doenças, tornando regiões impróprias para o cultivo de determinada espécie.

Várias doenças de importância econômica estão associadas à transmissão via semente. O patógeno pode ser carregado internamente e/ou transportado por frações impuras do lote, que podem conter micélios, corpos de frutificação e esporos de fungos; cistos ou galhas de nematóides, células e partículas bacterianas (MACHADO, 1988, 2000; BALARDIN et al., 2005).

Na cultura da soja, merece destaque a doença conhecida como Mofo Branco, causada



pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a qual desde 1999 vem apresentando níveis preocupantes de incidência nos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais, com perdas da ordem de 30%, podendo atingir até 100% em períodos chuvosos, caso medidas preventivas não forem tomadas (FERREIRA et al., 1979; HARTMAN et al., 1999; CARREGAL et al., 2005; LEITE, 2005; EMBRAPA, 2010; JULIATTI e JULIATTI, 2010; JACCOUD-FILHO et al., 2010).

A disseminação do fungo *S. sclerotiorum* normalmente tem sido considerada somente pela presença de escleródios. De acordo com a Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o nível de tolerância do fungo em lotes de sementes está baseado na presença de escleródios. Porém, estes são estruturas de resistência que podem permanecer viáveis por até 11 anos e serem transportados entre as sementes (contaminação concomitante) ou serem formados por sementes infectadas interna ou externamente pelo patógeno (Neergaad, 1979). Em trabalho realizado por Yang et al. (1998) constatou-se que o patógeno pode ser transmitido pela semente internamente infectada, sendo que Steadman (1983) observou que uma semente é capaz de formar mais de um escleródio e este, por sua vez, formar até 20 apotécios, os quais têm a capacidade individual de liberar 2.000.000 de ascósporos no ambiente. Assim, a semente pode ser considerada um grande potencial de inóculo e a detecção do patógeno *S. sclerotiorum* em lotes de sementes de soja pode evitar a disseminação da doença para novas áreas.

Existem vários procedimentos para detecção do fungo *S. sclerotiorum* na semente. Dentre os métodos mais utilizados para soja, podem ser citados a incubação em “Blotter Test” e em Rolo de Papel, os quais tem como princípio de detecção a formação de escleródios pela semente. Há algumas variações de metodologias empregando períodos de incubação que podem variar de 7 a 30 dias e temperaturas de 7 a 20 °C; além da recomendação da utilização de herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4 D) ou restrição hídrica (manitol ou cloreto de sódio) com o objetivo de retardar a germinação das sementes durante a incubação, a qual dificulta a detecção de escleródios nas sementes (MENTEN, 1985; PERES, 1996; MACHADO et al., 2002; PARASI et al., 2006; APASSUL, 2008; BRASIL, 2009).

Outro método oficial amplamente empregado é a incubação em Meio Agar-Bromofenol - Neon, baseado na mudança de coloração do meio que ocorre na presença de substâncias ácidas (ácido oxálico) liberadas pelo patógeno *S. sclerotiorum* durante o seu crescimento, que em contato com o meio azul torna-o amarelo. Porém, outros fungos liberam

ácidos dificultando a identificação das sementes infectadas pelo patógeno (NASSER, 1995; PERES, 1996; MACHADO et al., 2002; BRASIL, 2009).

Baseado no fato de que a doença Mofo Branco tem causado perdas expressivas na produção de soja (LEITE, 2005; JACCOUD-FILHO et al., 2010) e que o principal meio de disseminação é por meio de sementes contaminadas (NEERGARD, 1979; STEADMAN, 1983; RICHARDSON, 1990; BOLTON, 2006), a eficiência dos testes de sanidade para detectar o patógeno *S. sclerotiorum* torna-se relevante no controle do avanço da doença para novas regiões.

Neste sentido, a presente pesquisa objetivou comparar os métodos de incubação em “Blotter Test”, Rolo de Papel e Meio Neon-S, amplamente utilizados para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, visando avaliar sua eficiência para análise de rotina de laboratórios, levando-se em consideração a sensibilidade, repetibilidade e o efeito do nível de incidência do patógeno na sensibilidade dos métodos.

## **2 - REVISÃO DE LITERATURA**

Dentre os principais fatores que limitam o rendimento da soja, as doenças são as mais importantes e de difícil controle, pois à medida que as plantações se expandem, multiplicam-se as doenças que infestam a cultura, diminuindo a produtividade agrícola. De acordo com Yorinori e Feksa (2001), a ocorrência de doenças é o fator limitante para obtenção de alto rendimento na produção de sementes de soja.

Várias doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus afetam a cultura da soja no Brasil, sendo que os fungos são os fitopatógenos mais importantes, pois causam a maioria das doenças de plantas. Roese et al. (2001), em levantamento de patógenos associados a cultivares de soja produzidas na região Oeste do Paraná, identificaram 21 patógenos infectando a cultura, sendo que 71% deles eram representados pelos fungos.

A disseminação dos fungos pode ser feita pelo vento, água, inseto e animais, mas nenhuma forma é tão eficiente quanto à semente, uma vez que o patógeno veiculado tem maior chance de provocar doença nas plantas oriundas da mesma e se espalhar para outras plantas saudáveis, iniciando uma epidemia. Há doenças em que a semente é o único meio de sobrevivência de uma safra para outra (YORINORI et al., 1979; RICHARDSON, 1990;

CARMONA et al., 2004; DHINGRA, 2005; TORRES et al., 2009).

A maioria dos patógenos da soja é transmitida pela semente e o uso de sementes portadoras destes, provenientes de diferentes áreas de produção, têm sido importante causa de introdução e aumento de novas doenças ou de raças fisiológicas de patógenos. O uso de sementes sadias, ou o seu tratamento químico, evitaria a disseminação (NEERGARD, 1979; CHOUDHURY, 1985; MACHADO, 1988; ZAMBOLIM, 2005; SOMDA, 2008)

Os fungos fitopatogênicos normalmente associados às sementes de soja são: *Phomopsis spp.*, *Colletotrichum truncatum*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium semitectum* e *S. sclerotiorum* (SINCLAIR, 1979; FERREIRA et al., 1979; RICHARDSON, 1990; ROESE, 2001; HENNING, 2005).

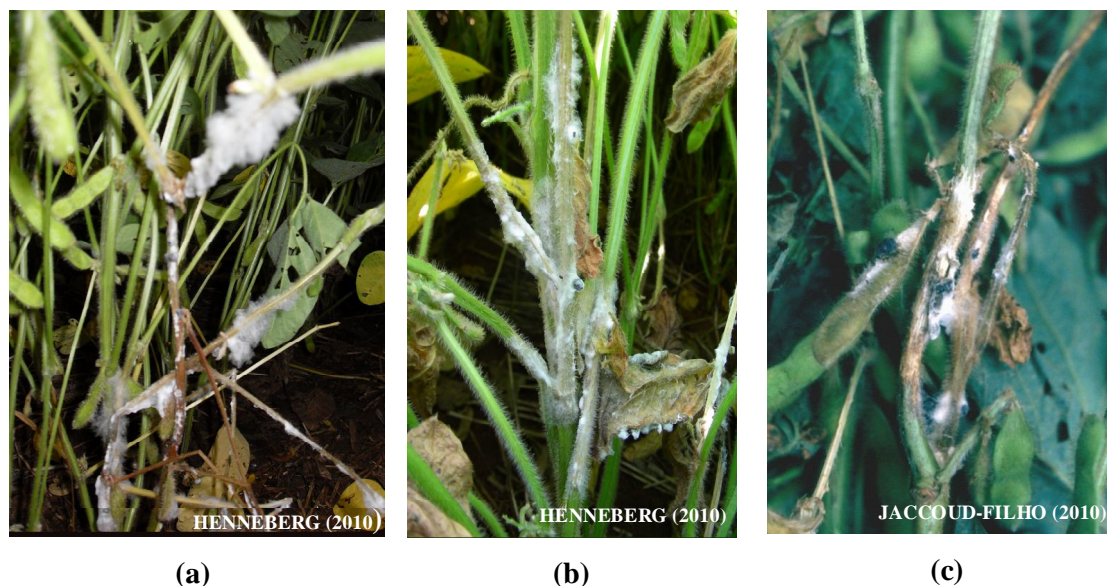
Menten (1995) relatou que a partir da safra 1976/77 foi detectada em lavouras de soja, no centro-sul do Paraná, a doença conhecida como Mofo Branco, causada pelo fungo *S. sclerotiorum*, sem verificar inicialmente problemas com a produtividade, uma vez que ocorreu em pequenas reboleiras, infectando poucas plantas por hectare. Porém, em função de uma série de fatores tais como: monocultivo, sucessão de culturas com espécies suscetíveis (girassol, canola, feijão e algodão), semeadura de sementes infectadas e condições ambientais favoráveis, a doença tornou-se um dos principais problemas no Estado do Paraná.

Yorinori e Feksa (2001), na safra 2000/01, verificaram perdas de 11,5% a 61,0% na região sul do Paraná, em decorrência de *S. sclerotiorum*. Mais recentemente, Carregal et al. (2008) observaram perdas de até 60 % na produtividade de soja, em áreas experimentais de agricultores. Jaccoud-Filho et al. (2010), estudando a suscetibilidade de cultivares de soja a *S. sclerotiorum* em área naturalmente infectada, observaram níveis de incidência que variaram de 14 a 96% da doença.

## 2.1. MOFO BRANCO

A doença conhecida como Mofo Branco ou Podridão Branca, causada pelo fungo *S. sclerotiorum*, recebe essas denominações em função dos sintomas e sinais externos causados na planta, a saber: presença de lesões encharcadas nos órgãos afetados, de coloração parda e consistência mole, com micélio branco, de aspecto cotonoso, cobrindo porções dos tecidos (FIGURA 1a). Na soja, os sintomas ocorrem geralmente no terço médio das plantas (FIGURA

1b), atingindo a haste principal, pecíolos, folhas e vagens. O patógeno também atinge internamente a haste principal da planta, formando micélios e escleródios (FIGURA 1c) (FERREIRA et al., 1979; STEADMAN, 1983; HARTMAN et al., 1999; LEITE, 2005; BOLTON et al., 2006; SAHARA, METHA; 2008, JULIATTI e JULIATTI, 2010).



**Figura 1.** Sintomas e sinais do fungo *S. sclerotiorum* em planta de soja: **a)** Encharcamento do limbo foliar na folha; **(b)** lesões e formação de micélio branco na haste; **(c)** Formação de micélio branco e escleródios em haste e vagens.

### 2.1.1 Etiologia

*S. sclerotiorum* é um fungo que apresenta as fases reprodutivas anamórfica e teleomórfica, pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Discomycetes, ordem Helotiales, família Sclerotiniaceae. É um fungo polífago, tendo como hospedeiras plantas de mais de 75 famílias, 278 gêneros e 408 espécies, dentro das quais incluem alfafa, feijões, trevos, ervilha, batata, fumo, hortelã, soja, girassol, tomate, canola, sendo as três últimas consideradas altamente suscetíveis. O milho e o sorgo não são culturas hospedeiras, considerando opções para a rotação de cultura (FERREIRA et al., 1979; STEADMAN, 1983;

HARTMAN et al., 1999; BOLTON et al., 2006; SAHARA e METHA; 2008; JULIATTI e JULIATI, 2010).

A disseminação pode ser feita por micélios dormentes, que podem sobreviver em resíduos de plantas infectadas e internamente na semente, ou pode ser transportado por frações impuras do lote de sementes que contém escleródios. Em condições climáticas favoráveis (alta umidade e temperaturas noturnas amenas), os escleródios germinam carpo geneticamente (forma teleomórfica), formando apotécios, onde são produzidos milhares de esporos denominados ascósporos. Estes liberam esporos no florescimento da soja, iniciando o desenvolvimento da doença na planta; os esporos são facilmente disseminados para as plantas da mesma lavoura. Pode ocorrer, mas raramente, a infecção miceliogênica (forma anamórfica) que consiste no desenvolvimento de hifas pelos escleródios, as quais infectam a planta de soja na sua base (FERREIRA et al., 1979; STEADMAN, 1983; HARTMAN et al., 1999; YANG et al., 1998; BOLTON et al., 2006; SAHARA e METHA, 2008; JULIATTI e JULIATTI, 2010)

Os escleródios são estruturas de resistência, que podem permanecer viáveis por até 11 anos, além de serem altamente resistentes a substâncias químicas, temperatura de 60 °C e ao congelamento. Têm sido verificadas, em algumas áreas de cultivo da soja, altas infestações do solo por escleródios do fungo, sendo comum encontrar até 258 escleródios m<sup>-2</sup> (MANOSSO et al., 2010a). Desta forma, essas áreas estarão impróprias para a rotação ou sucessão de culturas com feijão, algodão, girassol e canola, antes que esse inóculo inicial seja reduzido, o que limita a elaboração de um programa efetivo de rotação de culturas (CARDOSO et al., 2005; CARREGAL et al., 2005).

O controle de *S. sclerotiorum* é dificultado principalmente pela formação dos escleródios que podem sobreviver vários anos na ausência do hospedeiro e não se tem verificado eficiência dos fungicidas normalmente utilizados. Assim, as recomendações para o controle do Mofo Branco baseiam-se no sistema integrado de medidas, como rotação de culturas, espaçamento entrelinhas, época de semeadura, uso de fungicidas, controle biológico, e o uso de sementes isentas do patógeno (FERREIRA et al., 1979; HARTMAN et al., 1999; NASSER, 1999; JÚNIOR e ABREU, 2000; VIEIRA et al., 2001; FONTANA et al., 2006; REMUSKA e DALLA PRIA, 2007; DALLA PRIA e SILVA, 2010; EMBRAPA, 2010; GRABICOSKI et al., 2010; JACCOUD FILHO et al., 2010; JULIATTI e JULIATI, 2010; MANOSSO NETO et al., 2010b; VRISMAN et al., 2010).

Yang et al. (1998) comprovaram a transmissão de *S. sclerotiorum* pela semente de soja

internamente infectada, demonstrando que a mesma é um agente de disseminação do patógeno para novas áreas. Neste sentido, o uso de sementes isentas do fungo tem sido um dos principais meios de controle de inóculo da doença na fase inicial.

Considerando a semente como fonte inicial de inóculo de *S. sclerotiorum*, Hartman et al. (1998) fizeram levantamento da detecção do patógeno em lotes de sementes obtidas da *Association Improvement Crop Illinois* e concluíram a necessidade do levantamento da incidência do fungo na semente para determinar o potencial de disseminação de *S. sclerotiorum* para novas áreas.

#### 2.1.2. Transmissibilidade de *S. sclerotiorum* pela semente

O patógeno *S. sclerotiorum* pode ser transportado por escleródios presentes no lote de sementes, sendo um dos critérios de qualidade do mesmo, que de acordo com a Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, considera o nível de tolerância desse fungo em lotes de sementes baseado na presença de escleródios.

A transmissão do fungo via semente também pode ocorrer por este estar aderido à superfície da semente ou no interior da mesma (camadas externas ou no embrião). Tu (1988), estudando a capacidade da sobrevivência de *S. sclerotiorum* em sementes infectadas, por meio de micélios dormentes nos cotilédones, observou que sementes infectadas semeadas em terra/areia e que não germinaram, apodreceram e no seu lugar formaram de três a seis escleródios, concluindo que a detecção de micélios dormentes na semente do patógeno é importante não somente na disseminação do fungo, mas também na epidemiologia da doença.

Mueller et al. (1999) comprovaram a formação de escleródios com o desenvolvimento de apotécios em sementes de soja infectadas pelo patógeno *S. sclerotiorum* quando semeadas em campo, concluindo que a semente portadora irá infectar plantas e aumentar a quantidade de escleródios presentes no solo para as posteriores estações do ano.

A transmissibilidade de *S. sclerotiorum* pelas sementes não depende apenas da constatação de sua presença, mas também de fatores externos (ambientais e bióticos) e inerentes ao patógeno (patogenicidade, agressividade, potencial de inóculo, etc.) e ao hospedeiro (susceptibilidade/resistência, mecanismos de resistência, etc.). Workneh e Yang

(2000) observaram maior incidência de *S. sclerotiorum* nas regiões de Minnesota e Iowa (Estados Unidos) em função das condições ambientais favoráveis. Recentemente, Manosso et al. (2010 b), ao estudarem a incidência de *S. sclerotiorum* em plantas de soja semeadas em oito épocas (safra 2009/10), observaram que a incidência é maior nas semeaduras realizadas entre setembro e outubro, concluindo que as condições ambientais e as épocas de semeadura podem propiciar o desenvolvimento da doença, tornando-as áreas de risco para produção de sementes de soja.

Não existem muitos trabalhos na literatura sobre transmissibilidade do patógeno da planta-mãe para a semente de soja. Neste sentido, Hoffman et al. (1998), estudando a qualidade de sementes de soja produzidas em campos infestados pelo patógeno *S. sclerotiorum*, observaram a incidência de 0 a 95% no campo e constataram a presença do patógeno em um índice 0,3 a 0,7% nas sementes, podendo-se considerar que há uma baixa taxa de transmissão pela semente.

No entanto, pela relevância da transmissibilidade da doença Mofo Branco por sementes, uma vez que a detecção de uma semente é considerada um expressivo potencial de inóculo (STEADMAN, 1983; MUELLER et al., 1999) e, diante da importância da doença, que em condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento pode diminuir drasticamente a produção agrícola de sementes de soja (JACCOUD-FILHO et al. 2010), a detecção do patógeno na semente torna-se um parâmetro para tomada de decisão do controle da disseminação da doença para novas áreas.

## 2.2. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *S. sclerotiorum*

Desde 1984, o Comitê de Patologia de Sementes (COPASEM) da Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes (ABRATES), juntamente com o *Plant Disease Committee* (PDC) da *International Seed Testing Association* (ISTA), têm se preocupado com a aferição de testes de sanidade de sementes. O objetivo é a padronização de protocolos de detecção específicos para cada patógeno associado à semente (SOAVE e WETZEL, 1987; SHEPPARD, 1993; ISTA, 2007).

O teste de sanidade tem como objetivos estimar as condições sanitárias de um lote

para semeadura, orientar no tratamento de sementes, auxiliar no conhecimento da causa da baixa percentagem de germinação e vigor da semente, e estimar o risco de contaminação de novas áreas agrícolas (DHINGRA e SINCLAIR, 1995; SOAVE e WETZEL, 1987; MENTEN, 1995; NASSER, 1999; MACHADO, 2002; GOULART, 2005; HENNING, 2005).

A diagnose do fungo *S. sclerotiorum* em sementes tornou-se necessária ao se observar quedas da produção agrícola (CARREGAL et al., 2005; LEITE, 2005; SAHARA e METHA, 2008; JACCOUD-FILHO et al., 2010). A detecção da presença deste patógeno em uma semente infectada na amostra é preocupante, pois cada semente produz mais que um escleródio e que este, por si só, pode produzir 20 apotécios com a capacidade individual de liberar 2.000.000 ascosporos, em 10 dias (STEADMAN, 1983). Neste sentido, uma semente tem a possibilidade de produzir, no mínimo, 2.000.000 de focos de infecção.

Existem diferentes métodos para detecção de *S. sclerotiorum* na semente, com variações na sensibilidade, repetibilidade, economicidade e rapidez de resultados (MACHADO, 2002; GOULART, 2005; HENNING, 2005).

#### 2.2.1 Incubação em Substrato de Papel ou método do Papel de Filtro (“*Blotter Test*”)

O método do Papel de Filtro, mais conhecido como “*Blotter Test*”, tem por princípio a incubação das sementes sobre papel de filtro ou mata borrão, em caixa plástica transparente (11,0x11,0x3,5cm). Trata-se da combinação da câmara úmida (utilizada em patologia vegetal) com o teste de germinação (tecnologia de sementes), com o objetivo de prover condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno transportado pela semente (SOAVE e WETZEL, 1987; SHEPPARD, 1993; MACHADO et al., 2002; BRASIL, 2009).

Uma das dificuldades desse método para a detecção de *S. sclerotiorum* é o aparecimento de fungos fitopatogênicos e saprófitos de crescimento rápido, que podem encobrir o patógeno e dificultar a análise, pelo fato do fungo *S. sclerotiorum* ter desenvolvimento mais lento (HENNING, 2005). A desinfecção superficial poderia ser uma opção para diminuir o efeito indesejado; no entanto, o patógeno em questão tem seu inóculo externo e internamente à semente e com a desinfecção poderia ser removido da superfície das sementes.

Outras variações desse método utilizadas são: incubação em temperatura baixa de 7 °C, que resulta no desenvolvimento mais lento dos patógenos antagonistas; e uso da incubação



sob escuro contínuo, que não afeta o desenvolvimento do fungo *S. sclerotiorum* e diminui ou inibe o desenvolvimento dos fungos antagônicos (SOAVE e WETZEL, 1987; HENNEBERG et al., 2011 (no prelo)).

As Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009) recomendam para avaliação de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, girassol, ervilha e soja o uso de temperaturas de 10 a 15 °C, por período de incubação de 14 dias. Menezes (1987) e Koch e Menten (2000) consideram que 10 a 15 dias seriam o período de incubação necessário para a formação dos escleródios.

Adicionalmente, encontram-se também na literatura sugestões de temperatura de incubação variando de 7 a 20 °C. Neste sentido, Menten (1985) considerou que 7 °C é a temperatura adequada para formação dos escleródios; já a Associação dos Produtores e Comerciantes de Sementes e Mudanças do RS - APASSUL (2008) sugeriu a temperatura de 20°C; por outro lado, as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009) recomenda de 10 a 15 °C.

As condições para formação de escleródios são muito variáveis, como observaram Sun e Yang (2000) utilizando-se duas intensidades de luz, cinco níveis de temperatura e três de umidade do substrato (areia). Neste trabalho, os autores verificaram que para os tratamentos de baixa intensidade de luz (89 a 90 mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) a temperatura ótima de crescimento do escleródio é de 12 a 18 °C, sem influência da umidade. Já os tratamentos com alta intensidade de luz (120 a 130 mol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), a temperatura ótima de desenvolvimento é de 20 °C, a um nível de 670 a 700 mL de água para 4 kg de areia, correspondendo a formação de uma película de água sobre a areia.

Além das dificuldades com relação ao desenvolvimento do patógeno, no método “*Blotter Test*” a semente germina e ocorre o crescimento da plântula, o que dificulta a avaliação e manipulação das caixas plásticas. Uma das opções para retardar a germinação é a utilização do herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), umedecendo o substrato; porém, apresenta como desvantagens a manipulação de produto tóxico e o fato de não se ter um padrão de concentração, a qual pode variar de 0,02 a 0,50% (GOULART, 2001; FARIAS et al., 2003; MACHADO et al., 2003). A restrição hídrica também tem sido uma alternativa para o atraso da germinação durante o período de incubação, tendo por objetivo controlar o processo de hidratação da semente com o uso de substâncias como o manitol e o cloreto de sódio (COUTINHO, 2001; MACHADO 2003).

### 2.2.2. Incubação em Rolo de Papel

Anselme e Champion (1982) adaptaram o Teste de Germinação na detecção dos patógenos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Macrophomia phaseolina* e *Rhizoctonia solani*. em sementes de feijão. Parisi et al. (2006) constataram que o método de incubação em Rolo de Papel foi eficiente para detectar *S. sclerotiorum* em sementes de feijão.

Na Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) o método é recomendado para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão e de soja, sendo que os rolos devem ser mantidos em câmara de incubação a  $20 \pm 2$  °C, na ausência de luz, acondicionados em recipientes com atmosfera próxima a saturação, por 14 dias. Após este período, observa-se micélio tipicamente branco de *S. sclerotiorum* com formação de escleródios negros, irregulares, de forma esférica, com tamanho de 2 a 10 mm ao redor das sementes infectadas.

O método de incubação em Rolo de Papel tem princípio semelhante ao do Teste de Germinação de sementes, mas com a finalidade de detectar micélio cotonoso nas sementes analisadas, com a formação de escleródios em incubação sob escuro contínuo. A desvantagem desse método é a dificuldade para separar as sementes infectadas das sadias, podendo-se superestimar a incidência do patógeno *S. sclerotiorum* (PERES, 1996; PARISI et al., 2006).

Neste método, colocam-se 50 sementes sobre duas folhas de papel toalha umedecidas; sobre estas, uma terceira folha. Leva-se à incubação por 14 dias, a 20 °C, dentro de sacos plásticos para manutenção da umidade. Após a detecção do micélio cotonoso, as sementes são colocadas em caixas plásticas transparentes (11,0 x 11,0 x 3,5cm), sobre duas folhas de mata-borrão umedecidas, ficando incubadas de três a sete dias, a 20°C, sob regime de 12 horas de luz (BRASIL, 2009).

### 2.2.3. Incubação em Meio Agar-Bromofenol (Neon)

O método do Meio Neon foi descrito originalmente por Steadman et al. (1994) e Nasser et al. (1995) para detecção da viabilidade de escleródios do fungo *S. sclerotiorum*; em 1999, foi utilizado para detecção do patógeno em sementes de feijão. Consistia na utilização de meio de cultura Batata Destroxe Agar (BDA) com azul de bromofenol, um indicador de

pH, obtendo um meio de coloração azul e que devido a liberação de ácido oxálico pelo fungo torna-se amarelo.

O método do Meio Neon foi modificado por Napoleão et al. (2006), denominado Neon-S, pois era necessário o aperfeiçoamento para análise de rotina. Assim, foram testados indicadores, inibidores e antibióticos com ponto de fusão alto, não necessitando acrescentá-los após o meio BDA autoclavado. Esses autores concluíram também que não há a necessidade do pH ser ajustado após o meio esterelizado, que era dificultado pela alta temperatura do meio liquefeito e a rapidez do meio em solidificar-se.

O método do Meio Neon-S possui em sua composição, juntamente com o meio de cultura BDA, um antibiótico (cloranfenicol), o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e o indicador de pH azul de bromofenol. O antibiótico inibe o crescimento de bactérias e o ácido 2,4-D inibe a germinação de sementes das dicotiledôneas. Sem a presença do fungo, o meio mantém-se azul e, com a presença dele, torna-se amarelo. Porém, alguns fungos como *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* spp. produzem ácidos; para a distinção dos mesmos torna-se necessário o emprego de microscópico estereoscópico (NAPOLEÃO et al., 2006).

O método de Incubação em Meio Agar-Bromofenol (Neon) é promissor, pois segundo a literatura (NASSER, 1999; NAPOLEÃO et al., 2006) e a recomendação das Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009), o tempo de incubação para a detecção da presença do patógeno ocorre de cinco a oito dias, semelhantemente ao período requerido para os testes de sanidade utilizados nos laboratórios de análise de rotina.

## CAPÍTULO I

### EFICIÊNCIA DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM LOTES DE SEMENTES COMERCIAIS DE SOJA

**RESUMO** - A maioria dos patógenos de soja é transmitida pela semente, merecendo destaque o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, o qual tem apresentando níveis preocupantes de incidência em campo em vários estados brasileiros. O trabalho teve por finalidade verificar a eficiência de métodos de detecção do patógeno *S. sclerotiorum* em sementes de soja, infectadas artificialmente em laboratório e oriundas de áreas com o histórico da incidência da doença em campo. Para tanto, foram utilizadas amostras de sementes de sete cultivares, provenientes de áreas infestadas e uma amostra de sementes inoculada artificialmente. Compararam-se os seguintes métodos de detecção recomendados pela literatura “Blotter test”, a 7 °C, 14 °C e 20 °C, Rolo de Papel e Meio Neon. Pelos resultados obtidos, verificou-se que a sensibilidade dos métodos avaliados não detectaram e nem possibilitaram repetibilidade dos resultados para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes provenientes de áreas com incidência da doença; porém, foram eficientes para a detecção em sementes inoculadas artificialmente. No método de incubação em “Blotter Test” a 7 °C, observou-se menor incidência de outros fungos considerados indesejáveis durante as análises de sementes realizadas.

**Temas de indexação:** *Glycine max*, sanidade, mofo branco, qualidade sanitária.

## EFICACY OF METHODS TO DETECT *Sclerotinia sclerotiorum* SOYBEAN SEEDS

**ABSTRACT** – Most pathogens are transmitted by soybean seeds, with emphasis on *Sclerotinia sclerotiorum*, which has been showing worrying levels of incidence in soybean crop fields in some Brazilian states. This work was carried out to verify the efficiency of different methods for the detection of *S. sclerotiorum* in soybean seeds artificially infected in laboratory and from field production areas with a historical disease incidence. For this purpose, seed samples of seven cultivars from a natural infested fields and one seed sample artificially inoculated were used. The efficacy of the following recommended detection methods by the literature were compared: Filter Paper (“Blotter test”) at 7 °C, 14 °C and 21 °C, Paper Roll and Neon. The results obtained showed that the sensitivity of the methods evaluated not detected and not allowed repeatability of results for detection of *S. sclerotiorum* on seeds from areas with disease incidence, but were effective for detection in artificially inoculated seeds. In the “Blotter test” method at 7 °C there was a lower incidence of undesirable fungi in seed analysis.

**Index terms:** *Glycine max*, health, white mold, sanitary quality.

## INTRODUÇÃO

O complexo soja (grão, farelo e óleo) é um dos principais setores que contribuem significativamente para as exportações do agronegócio brasileiro, colaborando com o aumento do superávit do país, tanto pelo aumento de preços no mercado externo quanto pelo incremento da quantidade exportada (CONAB, 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor dessa oleaginosa. A produção de soja (*Glycine max* L. Merrill) na safra 2009/10 aumentou em 20%, comparativamente à safra anterior, sendo estimado para safra 2010/11 o incremento de aproximadamente cinco milhões de toneladas. O Estado do Paraná ocupa a primeira posição nacional, correspondendo a 19% da produção de sementes (EMBRAPA, 2008; CONAB, 2011).

O fator sanitário, por meio do controle de doenças transmissíveis pela semente, é relevante na produção agrícola, uma vez que danos decorrentes da associação patógeno/semente resultam na redução da emergência de plântulas e da produtividade (Jaccoud-Filho et al., 2002).

Na cultura da soja, merece destaque a doença conhecida popularmente como Mofo Branco, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a qual nos últimos anos tem levado a perdas de 11,5 a 96,0% na região sul do Paraná (Jaccoud-Filho et al., 2010; Yorinori e Feksa, 2001).

A semente é o principal veículo de disseminação; no entanto, seu transporte normalmente tem sido considerada somente pela presença de escleródios. De acordo com a Portaria nº 47, de 26 de fevereiro de 2009, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o nível de tolerância desse fungo em lotes de sementes está baseado na presença de escleródios. No entanto, a semente pode estar infectada internamente pelo patógeno *S. sclerotiorum* (Yang et al., 1998) ou infectada externamente, por meio de hifas localizadas no tegumento (Soave e Wetzels, 1987; Zambolim, 2005). Segundo Steadman (1983), uma semente infectada por este patógeno produz mais do que um escleródio e este, por si só, pode produzir 20 apotécios com capacidade individual de liberar de 2.000.000 ascósporos, em 10 dias. Portanto, uma semente tem a possibilidade de produzir, no mínimo, 2.000.000 de focos de infecção.

Neste sentido, a busca de um protocolo adequado para a diagnose do fungo *S. sclerotiorum* em sementes tornou-se necessária por se observarem reduções da produção

agrícola e pelo fato da semente ser o principal veículo de disseminação (EMBRAPA, 2008; Jaccoud-Filho et al., 2010).

Existem diferentes métodos para detecção de *S. sclerotiorum* na semente, com variações na sensibilidade, repetibilidade, economicidade e rapidez de resultados (Machado, 2000; Henning, 2005).

O método amplamente utilizado entre os laboratórios de patologia de sementes é o do “Blotter Test” (Brasil, 2009) para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, girassol, ervilha e soja, sendo recomendado o uso de temperaturas de 10 a 15 °C, por período de incubação de 14 dias. Porém, as condições para formação de escleródios é muito variável: em condições de baixa intensidade de luz (89 a 90 mol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) a temperatura ótima de crescimento do escleródio é de 12 a 18 °C, sem influência da umidade; já com alta intensidade de luz (120 a 130 mol.m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), a temperatura ótima de desenvolvimento é de 20 °C, com uma quantidade de 670 a 700 mL de água para 4 kg de areia, correspondendo á formação de uma película de água sobre a areia (Sun e Yang, 2000). Encontram-se, também, na literatura sugestões de temperaturas de incubação variando de 7 a 20 °C e recomendações de dias para incubação de 10 a 30 dias (Koch e Menten, 2000; APASSUL, 2008).

O método de incubação em Rolo de Papel também é descrito na literatura por Peres (1996) e Parisi et al. (2006), apresentando como desvantagem a dificuldade para separar as sementes infectadas das sadias, ou seja, sementes infectadas podem contaminar as sementes ao seu redor podendo superestimar a incidência do patógeno *S. sclerotiorum*.

O método Meio Neon (Brasil, 2009), por sua vez, consiste na utilização de um indicador de pH em meio de cultura, tornando o meio amarelado devido a liberação de ácido oxálico pelo fungo *S. sclerotiorum*. No entanto, alguns fungos como *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* spp. são também produtores de ácido, tornando-se necessário o emprego de microscópico estereoscópico para melhor distinguir os mesmos (Napoleão et al., 2006).

Apesar da existência de vários métodos recomendados na literatura, como os expostos nos parágrafos anteriores, não existem estudos da eficiência destes métodos na detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja comerciais.

Diante do exposto, o trabalho teve por objetivo verificar a eficiência de métodos de detecção do patógeno *S. sclerotiorum* em sementes de soja, inoculadas artificialmente em laboratório e provenientes de áreas com o histórico da incidência da doença em campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no período de junho de 2009 a setembro de 2010 no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, na Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG.

Foram utilizadas amostras de sementes de sete cultivares de soja, provenientes de áreas com histórico da incidência de *S. sclerotiorum*, e uma amostra de sementes sadias a qual foi inoculada artificialmente.

As seguintes cultivares foram utilizadas:

a) Safra 2008/2009: CD 231RR e BRS 255RR, provenientes da região de Ponta Grossa; CD 219RR, da região de Teixeira Soares e, CD 206, da região de Carambeí;

b) Safra 2009/2010: BRS 255RR da região de Ipiranga; Spring RR e Don Mario 5.8i RR da região de Arapoti.

As amostras de sementes provenientes de regiões infestadas com *S. sclerotiorum* foram obtidas no momento da colheita.

Para análise da amostra de sementes sadias a qual foi artificialmente inoculada utilizou-se a cultivar CD 206, proveniente de área sem histórico da incidência de *S. sclerotiorum* da Região de Ponta Grossa (Fazenda Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa). A inoculação foi realizada segundo o método citado por Machado et al. (2001). Assim, foram colocadas 200 sementes de soja em placas de Petri (9 cm) contendo *S. sclerotiorum* desenvolvido em meio de Batata–Dextrose-Agar (BDA) por 14 dias, ficando em contato com o micélio por um período de 48 horas, incubados em B.O.D a 20 °C, sob escuro contínuo. As sementes foram retiradas e deixadas em temperatura ambiente para secar.

Para cada cultivar estudada foram colhidos 10 kg de sementes. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas utilizando-se método mecânico, que consistiu na divisão da amostra em duas partes aproximadamente iguais e homogêneas; que foram passadas duas vezes pelo divisor de solo removendo a metade da porção e recompondo-a posteriormente. O processo de divisões sucessivas foi repetido até que se obtiveram quatro subamostras de trabalho com 2,5 kg cada (Brasil, 2009).

Após o procedimento, as amostras foram acondicionadas em sacos de papel Kraft e armazenadas a 12 °C e 48% de umidade relativa. Foi realizada a homogeneização das sementes toda vez que foram retiradas sementes para análise, por meio da agitação manual.



Os seguintes testes de sanidade de sementes foram comparados:

**a) Método do “Blotter test” a 7 °C:** foram utilizadas caixas plásticas (11 x 11 x 3,5 cm) - “gerbox”, previamente higienizadas com hipoclorito de sódio a 5%, contendo como substrato duas folhas de papel de filtro 80 g.m<sup>-2</sup> (10 x 10 cm), esterilizado em autoclave a 1 atm (120 °C), por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada água esterilizada na proporção 2,5 vezes a massa do papel e sobre este foram dispostas sementes escolhidas aleatoriamente, no formato 5 x 4, sendo 20 caixas com 20 sementes por “gerbox”, totalizando-se 400 sementes. Em seguida, foram incubadas a 7 °C durante 30 dias em escuro contínuo. As avaliações foram realizadas a cada seis dias, por meio da observação visual da formação de escleródios;

**b) Método do “Blotter Test” a 14 °C:** desenvolvido da mesma maneira descrita no item (a), porém com incubação a 14 °C;

**c) Método do “Blotter Test” a 20 °C:** desenvolvido da mesma maneira descrita no item (a), porém com incubação a 20 °C;

**d) Método de Incubação de Rolo de Papel:** consistiu na utilização do rolo de papel de germinação (Germitest ®), 28 x 37,5 cm, o qual foi previamente esterilizado em autoclave a 1 atm (120 °C), por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada água esterilizada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. Cada rolo foi constituído de três folhas de papel de germinação: duas sob as sementes e uma cobrindo-as. Foi realizado o exame laboratorial de 400 sementes, distribuídas em oito rolos com 50 sementes para cada rolo, que posteriormente foram incubadas no germinador a temperatura de 20 °C, sob condições de 100% de umidade relativa e regime de escuro contínuo. As avaliações foram realizadas após 14 dias de incubação por meio da observação visual da formação de escleródios. Quando não foi possível a sua observação, plântulas infectadas e sementes mortas (circundadas por micélio característico de *Sclerotinia sclerotiorum*) foram transferidas para caixas plásticas (11 x 11 x 3,5 cm), contendo duas folhas de papel de filtro previamente umedecido com água na proporção de 2,5 vezes a massa do substrato. Após três dias de incubação a 20 °C e, sob regime de 12 horas de luz por 12 horas de escuro contínuo, foi observada a formação de escleródios nas sementes e plântulas;

**e) Método Neon-S:** empregado o procedimento descrito por Nasser et al. (1995), utilizando-se meio de cultura contendo as seguintes substâncias por litro: 39 g Batata-Dextrose-Agar (BDA), 50 mg de azul de bromofenol, 50 mg de cloranfenicol e 50 mg de ácido livre 2,4-D. Posteriormente, o mesmo foi autoclavado a 1 atm (120 °C) por 20 minutos, obtendo-se um meio de coloração azul que foi vertido em placas de Petri. Em seguida, foram

tomadas aleatoriamente 10 sementes colocadas em placa com o meio Neon-S, totalizando 40 placas e 400 sementes. Em sequência, as placas foram incubadas a 20 °C no escuro e as leituras foram realizadas por um período de cinco a oito dias, observando a formação do halo amarelo em torno da semente.

Os métodos foram comparados quanto: a sensibilidade na detecção de *S. sclerotiorum*; a repetibilidade dos resultados e a incidência de fungos considerados indesejáveis durante as análises.

Para a avaliação da sensibilidade dos métodos na detecção de *S. sclerotiorum* foi determinada a porcentagem de sementes com a presença deste fungo. Para verificar a repetibilidade dos resultados de cada método avaliado, o ensaio foi repetido quatro vezes sendo analisadas quatrocentas sementes por repetição. Os resultados dos quatro ensaios foram comparados entre si. Na avaliação da incidência de outros fungos considerados indesejáveis durante as análises, determinou-se o número de sementes com a presença destes fungos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste *t* e Tukey por meio do programa estatístico SASM-Agri (Canteri, 2001).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados sobre a sensibilidade dos métodos estudados para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja encontram-se na Tabela 1. Apesar de não terem sido verificadas diferenças estatísticas entre os métodos, os dados obtidos revelaram que nas sementes inoculadas artificialmente em laboratório (cultivar CD 206), o fungo *S. sclerotiorum* foi detectado em 100% das sementes pelos testes de sanidade utilizados rotineiramente em patologia de sementes. Entretanto, foi de difícil detecção nas sementes infectadas naturalmente, ou seja, sementes de lotes provenientes de áreas infestadas.

Nasser et al. (1999), em levantamento realizado, observaram que os testes empregados para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes comerciais de feijão apresentam sensibilidade de 0,25 a 2,30%, ressaltando que apesar da baixa porcentagem (0,25% - 1 em

400 sementes), esta representa 625 focos primários da doença (para uma população de 250.000 plantas.ha<sup>-1</sup>). Por sua vez, Peres (1996) verificou que a detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de feijão e soja raramente ultrapassa o índice de 2%.

Hoffman et al. (1998), estudando a qualidade de sementes de soja produzidas em campos infestados, observaram a incidência de 0 a 95% no campo e constataram a presença do patógeno em um índice de 0,3 a 0,7% nas sementes.

Essa literatura confirma os dados obtidos nesta pesquisa pelos métodos: “Blotter test” a 7 °C, que detectou a presença de *S. sclerotiorum* nas cultivares Spring RR (1,5%) e Don Mario 5.8iRR (0,50%); “Blotter Test” a 14 °C, nas cultivares BRS 255RR da safra 2008/09 (0,25%) e CD 219RR (1,00%); Rolo de Papel, que constatou a presença de escleródios na cultivar CD 206 (0,25%); e Neon, o qual detectou na cultivar BRS 255RR da safra 2009/10 (0,50%).

Na Tabela 1 encontram-se os dados referentes aos dias de incubação para cada método estudado. As sementes inoculadas artificialmente em laboratório (cultivar CD 206) foram detectadas pelos testes de sanidade de sementes em sete dias, com exceção do método “Blotter test” a 7 °C, em que a detecção ocorreu em 14 dias. Entretanto, nas sementes provenientes de áreas infestadas naturalmente, a presença de escleródios foi detectada entre sete a 30 dias de incubação. Esses resultados estão de acordo com Napoleão et al. (2006) que, inoculando sementes de soja com *S. sclerotiorum*, constataram a presença de escleródios em cinco dias.

Os resultados obtidos podem ter sido consequência da amostragem, pois foi utilizado o mesmo procedimento empregado para a obtenção de amostras de trabalho indicado pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009), o que talvez possa não ser representativo para a detecção de patógenos presentes em um lote de sementes com baixo índice de infecção, que ocorre quando as mesmas são provenientes de plantas infectadas naturalmente, conforme relatado por diversos autores (Peres, 1996; Nasser et al., 1999; Morrison, 1999; Henning et al., 2009).

Indiretamente, isso poderia afetar os resultados da análise sanitária da semente resultando em falsos negativos, ou seja, considerar que o lote não contenha *S. sclerotiorum* na semente, sendo que o patógeno está presente no lote. Henning et al. (2009) verificaram que em 10.400 sementes de soja, incubadas pelo método “Blotter Test”, foram observadas apenas oito sementes inoculadas por *S. sclerotiorum*. Assim, há possibilidade que analisando somente 400 sementes não se detecte a presença do patógeno na semente, resultando num falso

negativo. Portanto, estudos de amostragem devem ser uma das abordagens pesquisadas para novos parâmetros de representatividade do teste de detecção deste patógeno em sementes.

Na Tabela 2 são apresentados os dados obtidos para repetibilidade dos resultados de cada método. Os valores obtidos não diferiram estatisticamente entre si, mas ressalta-se que quando o mesmo método de detecção de *S. sclerotiorum* foi repetido, para a mesma amostra, obtiveram-se resultados diferentes, possibilitando a interpretação de resultados como falso negativo. Segundo Sheppard (1993), o nível de tolerância da obtenção de um resultado falso negativo depende da importância epidemiológica e do controle da doença.

Pela relevância da transmissibilidade por sementes da doença Mofo Branco, uma vez que a detecção de uma semente é considerada um grande potencial de inóculo (Steadman, 1983; Mueller et al., 1999) e, diante da importância da doença, que em condições ambientais favoráveis para seu desenvolvimento pode diminuir drasticamente a produção agrícola de sementes de soja, o resultado falso negativo não pode ser tolerado, pois há a possibilidade de que, com a repetição do teste de sanidade, a detecção da doença na semente seja verificado.

Outro aspecto a ser observado é que não há um parâmetro de dias de incubação necessários para a detecção do patógeno *S. sclerotiorum* em sementes de soja, o qual pode variar de sete a 30 dias (Tabela 1).

Na comparação da presença de outros fungos considerados indesejáveis durante as análises, observa-se na Figura 1 que na temperatura mais baixa (7 °C), o desenvolvimento destes fungos, representados por *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* sp., foi mais lento, demorando em média 14 dias de incubação. A quantificação dos gêneros não foram realizadas, uma vez que não poderia manipular as sementes incubadas nos “gerbox”.

Observa-se, nas sementes inoculadas artificialmente em laboratório (cultivar CD 206), que não houve a presença de fungos considerados indesejáveis, uma vez que o crescimento do *S. sclerotiorum* foi mais rápido, infectando toda a semente (Figura 1).

Constatou-se que, à medida que a temperatura de incubação aumentou, os patógenos indesejáveis se desenvolveram mais rapidamente e, dependendo do nível de contaminação das sementes, em sete dias aproximadamente 300 sementes a serem analisadas já estavam infectadas (Figuras 2 e 3). Além da temperatura, observou-se que com a utilização de meio de cultura, como no método Neon (Figura 4), há o enriquecimento do substrato, possibilitando condições adequadas para o rápido desenvolvimento de fungos antagônicos ou indesejáveis.

Pelos resultados obtidos, o método “Blotter test” a 7 °C foi o que mostrou os menores níveis de fungos indesejáveis nas primeiras semanas de incubação, possibilitando a observação da formação de escleródios nas sementes infectadas. Tal fato seria dificultado, ou não observado, em temperaturas mais altas, as quais possibilitam o desenvolvimento de fungos indesejáveis com maior rapidez, podendo até encobrir os escleródios formados, possibilitando conforme os níveis de crescimento desses fungos nas sementes, resultado falso negativo na detecção de *S. sclerotiorum* na semente.

Pela disseminação, a qual vem ocorrendo no Brasil da doença causada pelo patógeno *S. sclerotiorum*, provavelmente via semente, há a necessidade de aprimoramento dos métodos de detecção em sementes, relacionando-os com a realidade da incidência da doença no campo.

## CONCLUSÕES

1. Verificou-se que a sensibilidade dos métodos avaliados não detectaram e nem possibilitaram repetibilidade dos resultados para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes provenientes de áreas com histórico da doença Mofo Branco;
2. Para amostras de sementes de soja inoculadas artificialmente, com elevado nível de incidência do fungo, todos os métodos testados foram sensíveis e possibilitaram a repetibilidade dos resultados para detecção de *S. sclerotiorum*;
3. O método de “Blotter Test” a 7 °C possibilitou a melhor inibição do desenvolvimento de outros fungos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pelo auxílio financeiro ao Projeto Edital 064/2008.

## REFERÊNCIAS

APASSUL - ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RIO GRANDE DO SUL – (2008) **Método citado para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em semente de soja.** Disponível em: <<http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=15ea=detailseID=42>>. Acesso em: 4 jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Manual de análise sanitária de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 200p.

CANTERI, M. G., ALTHAUS R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE SAFRA BRASILEIRA.. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento**, Brasília: Conab, 2011. 40 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_03\\_10\\_09\\_03\\_02\\_boletim\\_marco-](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_10_09_03_02_boletim_marco-)

11[1].pdf>. Acesso em: 26 mar. 2011

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2009 e 2010.**- Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados : Embrapa Agropecuária Oeste, 2008. 262p. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja).

HENNING, A. A. **Patologia de sementes.** Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2005. 52 p. (EMBRAPA-CNPSO – Documentos, 264)

HENNING, A.A.; PAULA, F.Y.H. DE; MOMTEMEZZO, C.A.O.; BOSSE, E.J.; BERGONSI, J.S.S. Avaliação de princípios ativos para o controle químico de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja – safra 2008/2009. **Informativo ABRATES**, v.19, n.1, p.29-31, 2009.

HOFFMAN, D. D., HARTMAN, G. L., MUELLER, D. S., LEITZ, R. A., NICKELL, C. D., AND PEDERSEN, W. L. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.82, p.826-829, 1998.

JACCOUD-FILHO, D. S., VENANCIO, W. S., COLTURATO, A. B., HENNEBERG, L. Avaliação sanitária de sementes de soja provenientes de plantas mortas por apodrecimento radicular. **Revista Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.120- 121. 2002.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.;

DEMARCH, V. B. e ROCHA, C. H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná: XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16, 2010, Brasília. **Resumos:** Brasília: EMBRAPA-SOJA, 2010, 226-228p.

KOCH, E.F.A.; MENTEN, J.O.M. Método alternativo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p. 276-279, 2000.

MORRISON R. H. Sampling in Seed Health Testing. **Phytopathology**, v.89, p.1084-1087, 1999.

MACHADO, J.C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: Carvalho, N.M. e Nakagawa, J. (Eds.). **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, p. 522-588, 2000.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C; ALVES, M.C. Inoculação de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 23, n.2, p. 95-101, jul./dez. 2001.

MUELLER, D. S., HARTMAN, G. L., AND PEDERSEN, W. L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, v.83, p.1113-1115, 1999.



NAPOLEÃO, R.; NASSER, L.C.B.; LOPES, C.A.; CAF, FILHO, A.C. Neon-S, a new medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on seeds. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.2, p.180-182, 2006.

NASSER, L. C. B.; NAPOLEÃO, R.; CARVAJAL, R. A. Mofo branco - cuidado com a semente. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, São Paulo, n.4, mai.1999. Disponível em: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Helena/Meus%20documentos/Cl%C3%A1udio%20-%20UEPG/Est%C3%A1gio/Sclerotinia/artigo.asp.html>. Acesso em: 23 mai. 2008.

NASSER, L.C.B.; BOLAND, G.J.; SUTTON, J.C. Meio semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.376, 1995.

PARISI, J.J.D.; PATRÍCIO, F.R.A., OLIVEIRA, S.H.F. Modification of the paper towel seed health test for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**, v.32, n.3, p.288-290, 2006.

PERES, A.P. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill: Desenvolvimento de Metodologia**. 1996. 51p. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

SHEPPARD, J.W. Diagnostic sensitivity, especificity and predictive values in evaluation of new test. Methods. **In: PROCEEDINGS 1<sup>ST</sup> ISTA PLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING**, 1993, Ottawa, Canada, p. 132-142.

SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fund. Cargill. 1987. 480p.

STEADMAN, J.R. White mold – a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, v.67, p.346-350, 1983.

SUN, P.; YANG, X. B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.84, n.12, p.1287-1290, 2000.

YANG, X. B.; WORKENEH, F.; LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. **Plant Disease**, v.82, p.264, 1998.

YORINORI, J.J. ; FEKSA, H. Importância da podridão da soja (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: Reunião de Pesquisa da Soja Região Central do Brasil, 2001, Londrina. **Resumo**. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2001. p.119. (documentos 157)

ZAMBOLIM, L. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes qualidade fitossanitária**. 22 ed. Cap. 4. Viçosa: UFV/DFP, p. 75-112, 2005.

**TABELA 1.** Comparação da sensibilidade de métodos utilizados para detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de sete cultivares de soja naturalmente infectada e de uma amostra artificialmente inoculada.

Métodos		Amostras de sementes							
		Naturalmente infectadas							Artificialmente Inoculada
		Safr 2008/09			Safr 2009/10				Safr 2008/09
		CD 206	BRS 255RR	CD 231RR	CD 219RR	Spring RR	Don Mario 5.8.i RR	BRS 255RR	CD 206
Incidência (%) de sementes infectadas									
“Blotter Test”	7 °C	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	1,50 <sup>ns</sup> (30)	0,50 <sup>ns</sup> (30)	0 <sup>ns</sup>	100 <sup>ns</sup> (14)
	14 °C	0	0,25 (30)	0	1,00 (30)	0	0	0	100 (7)
	20 °C	0	0	0	0	0	0	0	100 (7)
Rolo de Papel 20 °C		0,25 (14)	0	0	0	0	0	0	100 (7)
Neon 20 °C		0	0	0	0	0	0	0,50 (7)	100 (7)

<sup>ns</sup> Não significativo (p>0,05)

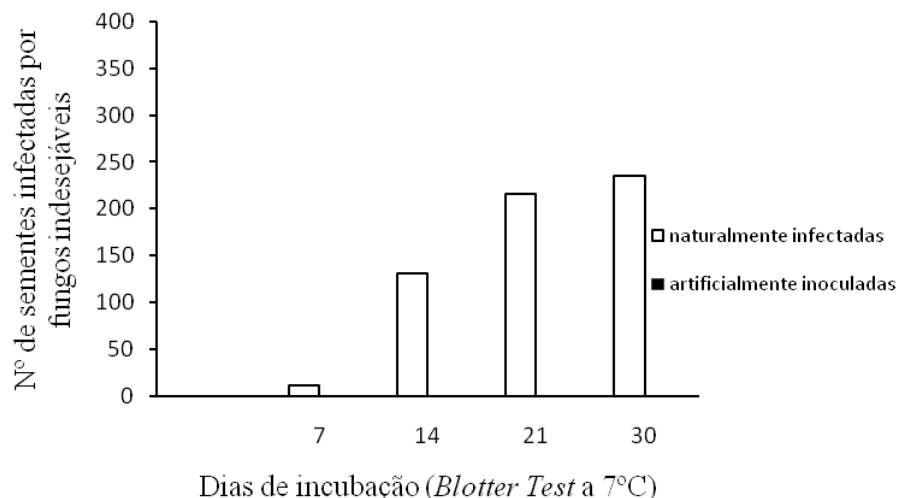
(<sup>^</sup>) Dias de incubação para a detecção da *S. sclerotiorum*

**TABELA 2.** Comparação da repetibilidade de métodos utilizados na detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de sete cultivares de soja naturalmente infectada e de uma amostra artificialmente inoculada.

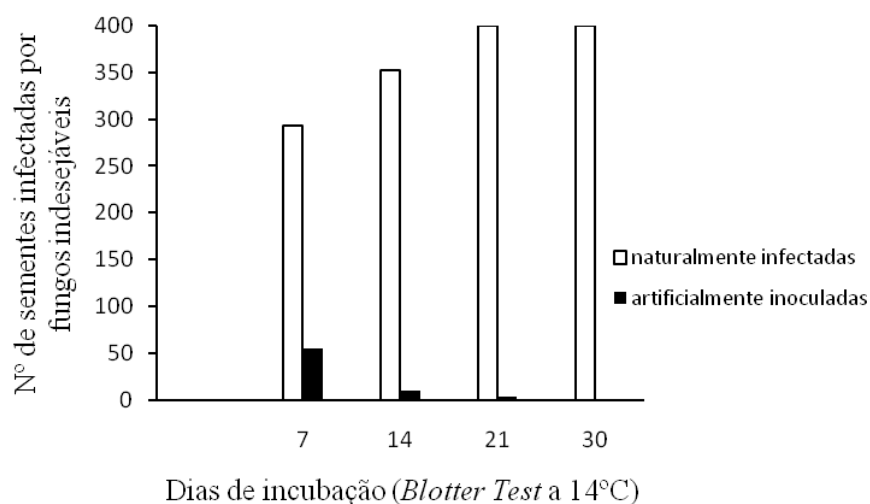
Métodos	Repetibilidade	Amostras de sementes							
		Naturalmente infectada							Artificialmente inoculada
		Safr 2008/09			Safr 2009/10				Safr 2008/09
		CD 206	BRS 255RR	CD 231RR	CD 219RR	Spring RR	Don Mario 5.8i RR	BRS 255RR	CD 206
		Incidência (%) de sementes infectadas							
<i>Blotter Test</i> 7 °C	R1 *	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0,50 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	100 <sup>ns</sup>
	R2	0	0	0	0	1,50	0	0	100
	R3	0	0	0	0	0	0	0	100
	R4	0	0	0	0	0	0	0	100
<i>Blotter Test</i> 14 °C	R1	0	0	0	1,00	0	0	0	100
	R2	0	0	0	0	0	0	0	100
	R3	0	0	0	0	0	0	0	100
	R4	0	0,25	0	0	0	0	0	100
<i>Blotter Test</i> 20 °C	R1	0	0	0	0	0	0	0	100
	R2	0	0	0	0	0	0	0	100
	R3	0	0	0	0	0	0	0	100
	R4	0	0	0	0	0	0	0	100
<b>Rolo de Papel</b> 20 °C	R1	0,25	0	0	0	0	0	0	100
	R2	0	0	0	0	0	0	0	100
	R3	0	0	0	0	0	0	0	100
	R4	0	0	0	0	0	0	0	100
<b>Neon</b> 20 °C	R1	0	0	0	0	0	0	0	100
	R2	0	0	0	0	0	0	0	100
	R3	0	0	0	0	0	0	0,50	100
	R4	0	0	0	0	0	0	0	100

<sup>ns</sup> Não significativo (p>0,05)

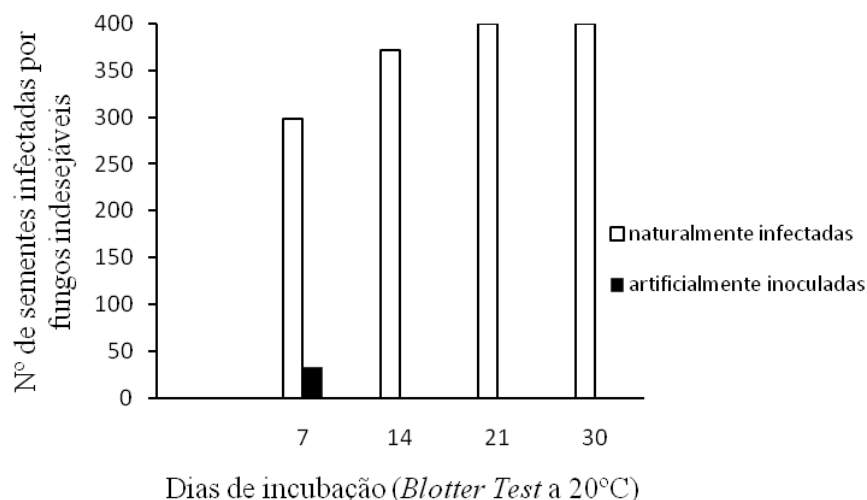
\*Repetibilidade: cada método repetido quatro vezes (R1, R2 ,R3 e R4), sendo analisadas 400 sementes por repetição.



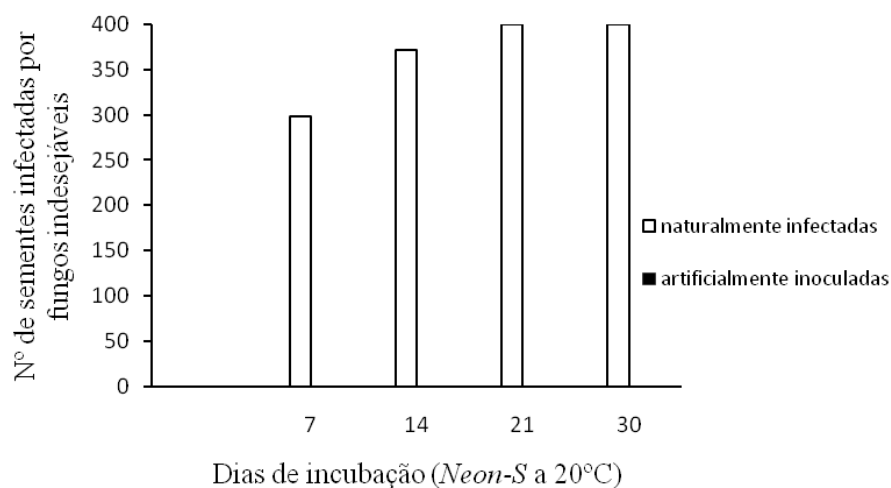
**FIGURA 1.** Número de sementes (incidência) com a presença de outros fungos observada no método “Blotter Test” a 7 °C, em relação aos dias de incubação em amostras de sementes de soja, oriundas de áreas naturalmente infestadas e em uma amostra inoculada artificialmente por *S. sclerotiorum*.



**FIGURA 2.** Número de sementes (incidência) com a presença de outros fungos observada no método “Blotter Test” a 14 °C, em relação aos dias de incubação em amostras de sementes de soja, oriundas de áreas naturalmente infestadas e em uma amostra inoculada artificialmente por *S. sclerotiorum*.



**FIGURA 3.** Número de sementes (incidência) com a presença de outros fungos observada no método “Blotter Test” a 20 °C, em relação aos dias de incubação em amostras de sementes de soja, oriundas de áreas naturalmente infestadas e em uma amostra inoculada artificialmente por *S. sclerotiorum*.



**FIGURA 4.** Número de sementes (incidência) com a presença de outros fungos observada no método Neon-S a 20 °C, em relação aos dias de incubação em amostras de sementes de soja, oriundas de áreas naturalmente infestadas e em uma amostra inoculada artificialmente por *S. sclerotiorum*.

## CAPÍTULO II

### NÍVEL DE INCIDÊNCIA DE *S. sclerotiorum* L. Bary EM SEMENTES DE SOJA E SUA INFLUÊNCIA NA SENSIBILIDADE DOS TESTES DE DETECÇÃO

**Resumo** - Os prejuízos causados pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum* em soja têm sido objetivo de estudo de vários trabalhos, sendo que pesquisas envolvendo a detecção do patógeno na semente constituem fator fundamental para a redução da disseminação da doença. Existem diferentes métodos para detecção de *S. sclerotiorum* na semente, que necessitam ser aprimorados para uso em análise de rotina dos laboratórios. Este trabalho objetivou determinar a influência do nível de incidência do patógeno em sementes de soja na sensibilidade de detecção. Foram realizados experimentos entre os anos 2008 e 2011, sendo utilizadas amostras de sementes de soja artificial e naturalmente infectadas, com a incidência conhecida da doença nas amostras e no campo. Os métodos de incubação empregados foram em: “Blotter Test”; Rolo de Papel e Meio Neon-S. Observou-se a detecção nas sementes inoculadas artificialmente na proporção que se aumentou a incidência na amostra e, nas sementes infectadas naturalmente, as porcentagens variaram 0,25 a 3,0 %. Nas amostras de sementes de plantas infectadas, o método “Blotter test” detectou maior incidência, porém, independente do método não observou detecção uma das amostras. Pode-se concluir que os níveis de incidência do patógeno em sementes de soja interferiram na sensibilidade dos métodos de detecção, não sendo observada a relação entre a incidência no campo e na semente colhida. Pelos métodos estudados as sementes provenientes de plantas de soja infectadas não necessariamente podem estar contaminadas pelo patógeno.

**Termos para indexação:** Mofo Branco, “Blotter Test”, Rolo de Papel, Neon

## **INFECTION LEVEL OF *S. sclerotiorum* L. Bary ON SOYBEAN SEEDS AND ITS INFLUENCE ON DETECTION TESTS SENSIBILITY**

**ABSTRACT** - The damage caused by the pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean have been studied by several studies, and research involving the detection of the pathogen in the seed is a key factor in reducing the spread of disease. There are different methods for detection of *S. sclerotiorum* in the seeds, which need to be improved for use in routine analytical laboratories. The aim of this study was determine the influence of incidence level of *S. sclerotiorum* on soybean seeds, in detection tests sensibility. Experiments were performed during three agricultural years (between 2008 and 2011), using samples of soybean seeds: a) artificially contaminated, with known pathogen incidence; b) coming from areas with known pathogen incidence at field; c) visually healthy, harvested directly from infected plants. The incubation methods used were: on Filter Paper; Paper Roll and medium Neon-S. Was possible conclude that the incidence levels of the pathogen *S. sclerotiorum* in soybean seeds interfered in the detection methods sensibility, and no relationship was observed between the incidence at field and the incidence verified on harvested seeds. The seeds from infected soybean plants will not be necessarily infected by the pathogen.

**Index terms:** White Mold, Blotter Test, Paper Roll, Neon



## INTRODUÇÃO

*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um patógeno de importância mundial por ocorrer tanto em regiões temperadas quanto subtropicais e tropicais, além de ser um fungo polífago, abrangendo 408 espécies e 278 gêneros de plantas hospedeiras (Bolton et al., 2006). Epidemias causadas pelo patógeno, na cultura da soja, têm sido responsáveis pela diminuição da produção agrícola em vários países, chegando a perdas de 100 % em condições favoráveis (Steadman, 1983; Yang et al., 1998; Sahara & Mehta, 2007; Silva et al., 2008; Jaccoud-Filho et al., 2010).

A doença causada por este fungo é conhecida como Mofo Branco, sendo que sua disseminação ocorre principalmente pela semente, conforme relatado por Yang et al. (1998) em estudo que comprovou a transmissão de *S. sclerotiorum* pela semente de soja internamente infectada, revelando que a mesma é um agente de disseminação do patógeno para novas áreas. De acordo com a literatura, uma semente infectada corresponde a 2.000.000 de focos de infecção, considerando a formação de um escleródio por semente (Steadman, 1983).

O fungo é de difícil erradicação depois de introduzido na área (Lobo Junior, 2010). Assim, a detecção preventiva nas sementes constitui-se em uma das medidas mais econômicas e importantes para se evitar a introdução da doença em novos locais e a sua disseminação em lavouras comerciais (Bilsen, 1999).

A detecção de *S. sclerotiorum* na semente torna-se uma ferramenta fundamental para tomada de decisão de controle da doença em novas áreas. Neste sentido, existem diferentes métodos para detecção do patógeno na semente de soja, podendo ser citados, especialmente, a incubação em Substrato de Papel ou método do Papel de Filtro (“Blotter Test”), em Rolo de Papel e em Meio Agar-Bromofenol Neon (Sheppard, 1993; Peres, 1996; Nasser, 1999; Machado, 2002; Taylor et al., 2006; BRASIL, 2009).

O método do “Blotter Test” consiste na incubação das sementes em temperaturas que variam de 7 a 20 °C, durante 10 a 30 dias (Koch et al., 1995; Peres, 1996; Koch & Menten, 2000; Machado et al., 2002; Brasil, 2009). Já a incubação em Rolo de Papel é conduzida de forma semelhante a do teste de germinação, sendo as sementes mantidas a 20 °C, por 14 dias (BRASIL, 2009).

Outro procedimento considerado promissor é a Incubação em Meio Agar-Bromofenol Neon, no qual as sementes são incubadas por sete dias, com recomendação de temperaturas de 14 e 20 °C, no escuro, sendo o patógeno detectado pela mudança de coloração do meio, que ocorre na presença de substâncias ácidas (ácido oxálico) liberadas durante o seu crescimento (Steadman et al., 1994; Peres, 1996; Nasser et al., 1999; Peres et al., 2002).

O método Neon foi modificado por Napoleão et al. (2006), denominando-o Neon-S, visando facilitar a sua preparação. Assim, testaram se reagentes com ponto de fusão alto, usando-se como indicador o azul de bromofenol, como inibidor de germinação o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e como antibiótico o cloranfenicol, que são adicionados antes do meio Batata-Dextrose-Agar (BDA) ser autoclavado. Estes autores verificaram, também, que não há necessidade do pH ser ajustado após o meio ser esterilizado, o que era dificultado pela alta temperatura do meio liquefeito e a sua rapidez em solidificar-se. Entretanto, na literatura alguns autores sugerem a necessidade do reajuste do pH (Machado et al., 2002; BRASIL, 2009).

A detecção de *S. sclerotiorum* na semente e a transmissibilidade de doenças por meio da mesma podem depender do nível de infecção do patógeno, pois quando a semente é infectada artificialmente em laboratório, o fungo é facilmente detectado por testes de sanidade. Em pesquisas onde sementes de soja foram inoculadas com *S. sclerotiorum*, constatou-se a presença de escleródios em poucos dias (Peres, 1996). Porém, são de difícil detecção as sementes infectadas naturalmente, ou seja, provenientes de áreas infestadas, conforme relatado por Koch (1998), que observou a detecção do patógeno em 35,1 % das amostras de sementes de feijão, provenientes de campos infestados.

Diante disso, o trabalho objetivou determinar a influência do nível de incidência de *S. sclerotiorum* em sementes de soja, na sensibilidade dos principais métodos de detecção (“Blotter Test”, Rolo de Papel e Meio Agar-Bromofenol, Neon-S).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos experimentos em três safras agrícolas da Região dos Campos Gerais – PR, no Laboratório de Patologia de Sementes (Universidade Estadual de Ponta

Grossa - UEPG) utilizando-se amostras de sementes de soja com diferentes incidências do patógeno *S. sclerotiorum*, discriminadas a seguir.

**a) Amostras de sementes de soja inoculadas artificialmente, com incidências conhecidas do patógeno (safra 2008/2009)**

Sementes de soja da cultivar CD 206, safra 2008/2009, provenientes de área sem histórico de ocorrência de *S. sclerotiorum*, localizada na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, foram infectadas artificialmente para obtenção de cinco amostras de sementes com incidências conhecidas da doença.

Obteve-se o isolado por meio de escleródios do fungo *S. sclerotiorum* (JATAÍ- Goiás) da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Uberlândia, que foram desinfestados superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 0,5 % por 5 minutos e lavados em água destilada esterilizada. Os escleródios desinfestados foram então transferidos para placas de Petri (90 mm), um escleródio por placa, contendo meio Batata-Dextrose-Agar (BDA), sendo incubados em B.O.D a 20 °C, por um período de 14 dias.

Em seguida, as sementes foram inoculadas pelo método de contato direto, sendo colocadas 200 sementes de soja em cada placa, em contato com o micélio, tendo sido realizada a incubação em B.O.D, a 20 °C, por um período de 48 horas, sob escuro contínuo. As sementes foram retiradas, secas em temperatura ambiente e misturadas às sementes sadias, obtendo-se amostras de 400 sementes com percentuais de incidência de: zero; 0,25 % (1/400); 0,50 % (2/400); 0,75 % (3/400) e 1,00 % (4/400).

**b) Amostras de sementes de soja oriundas de áreas nas quais foi acompanhada a incidência da doença no campo (safra 2009/2010)**

Para obtenção de amostras de sementes naturalmente infectadas, oriundas de áreas infestadas pelo patógeno *S. sclerotiorum*, foi monitorada a incidência da doença em 50 cultivares de soja, na região de Arapoti, durante a safra 2009/2010. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 50 tratamentos e quatro repetições. As parcelas constituíram-se de quatro linhas de 20 m cada, tendo sido realizado o monitoramento nas duas linhas centrais. As avaliações foram realizadas entre os estádios fenológicos V5 e R6 (Fehr & Caviness, 1977), sendo a incidência determinada pela média dos resultados das quatro parcelas. Escolheram-se seis cultivares, tendo como critério a incidência e o tempo e espaço físico para realização das análises, sendo obtidas as seguintes incidências em campo: 7,23 % (cultivar BRS 295 RR); 5,60% (cultivar FTS CASCAVEL RR); 3,14 % (cultivar Don

Mario 5.8i RR); 2,28 % (cultivar BRS 255 RR); 0,92 % (cultivar BRS 242 RR) e 0,27 % (cultivar NS 4823 RR).

No momento da colheita, foram colhidas manualmente as plantas das duas linhas centrais, as quais foram debulhadas em bateadeira Vencedora B350, obtendo-se aproximadamente 10 kg de sementes por cultivar, que foram colocadas em sacos de papel do tipo Kraft e enviadas ao laboratório. Em seguida, com auxílio de um calador do Tipo Simples, coletaram-se subamostras até a obtenção de uma amostra de trabalho de 500 g para cada cultivar, que foram acondicionadas em sacos de papel do tipo Kraft e armazenadas por quatro meses a 12 °C e 48 % de Umidade Relativa do ar, para posterior análise patológica.

**c) Amostras de sementes de soja, colhidas diretamente de plantas infectadas (safras: 2009/2010 e 2010/2011)**

Para obtenção de sementes naturalmente infectadas, foram marcadas as plantas infectadas por *S. sclerotiorum* no estágio fenológico R6 (Fehr & Caviness, 1977), localizadas em campos de produção de soja de duas regiões do Estado do Paraná: I) Arapoti (safra 2009/10), utilizando-se as cultivares Don Mario 5.8i RR (talhão A), Don Mario 5.8i RR (talhão B) e SPRING RR (NK 7054 RR); II) Pinhão( safra 2010/2011), trabalhando-se com as cultivares Nidera A 4725 RG e Don Mario 5.8i RR.

No momento da colheita, as vagens de soja provenientes de plantas infectadas foram colhidas e debulhadas manualmente. As amostras foram homogenizadas e acondicionadas em sacos de papel do tipo Kraft e armazenadas cinco meses a 12 °C, com 48 % de Umidade Relativa do ar, para posterior análise patológica.

São descritos, a seguir, os testes de sanidade de sementes utilizados para a detecção de *S. sclerotiorum* nas sementes.

**- Método de Incubação em “Blotter Test”:** foram utilizadas caixas plásticas (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) previamente higienizadas com hipoclorito de sódio a 5 %, contendo como substrato duas folhas de papel de filtro 80 g m<sup>-2</sup> (10 x 10 cm), esterilizado em autoclave a 1 atm (120 °C), por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada água destilada e esterilizada na proporção 2,5 vezes a massa do papel e sobre este foram dispostas sementes escolhidas aleatoriamente, no formato 5 x 4, com 20 sementes por caixa, totalizando-se 400 sementes. Em seguida, foram incubadas durante 30 dias em escuro contínuo. As avaliações foram realizadas a cada seis dias, por meio da observação visual da formação de escleródios. O método foi desenvolvido em três temperaturas de incubação: 7 °C, 14 °C e 20 °C.

**- Método de Incubação em Rolo de Papel:** consistiu na utilização do rolo de papel

de germinação (Germitest®), dimensão 28,0 x 37,5 cm, o qual foi previamente esterilizado em autoclave a 1 atm (120 °C), por 20 minutos. Em seguida, foi adicionada água destilada e esterilizada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel. Cada rolo foi constituído de três folhas de papel de germinação: duas sob as sementes e uma cobrindo-as. Realizou-se exame laboratorial de 400 sementes, distribuídas em oito rolos com 50 sementes cada, incubadas em germinador na temperatura de 20 °C, por um período de 14 dias, sob condições de 100 % de Umidade Relativa, em regime de escuro contínuo. As avaliações foram realizadas por meio da observação visual da formação de escleródios.

**-Método de Incubação em Meio Agar-Bromofenol Neon-S (Napoleão et al., 2006):** utilizou-se meio de cultura contendo as seguintes substâncias por litro: 39 g Batata-Dextrose-Agar (BDA), 50 mg de azul de bromofenol, 50 mg de cloranfenicol e 50 mg de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Posteriormente, o mesmo foi autoclavado a 1 atm (120°C) por 20 minutos, obtendo-se um meio de coloração azul que foi vertido em placas de Petri (90 mm). Em seguida, foram tomadas aleatoriamente 10 sementes, colocadas em placa com o meio Neon-S, totalizando 40 placas e 400 sementes. Posteriormente, as placas foram incubadas a 20 °C no escuro e as leituras realizadas de cinco a oito dias, com a formação de halo amarelo e observação do micélio característico.

O delineamento utilizado para o estudo da sensibilidade dos métodos foi o inteiramente casualizado, sendo cinco tratamentos (métodos) e quatro repetições para cada cultivar. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos quando significativos foram comparadas pelo teste de Tukey, por meio do procedimento GLM do software de estatística SAS® (Canteri et al., 2001). Foram realizadas, quando necessário, transformações de dados usando arcsen da raiz de  $x/100$ .

Realizou-se, adicionalmente, a repetibilidade de cada método avaliado para as amostras de sementes artificialmente infectadas e provenientes de áreas infestadas. Assim, cada método foi repetido quatro vezes por cultivar, tendo sido analisadas 400 sementes por repetição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos métodos para detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja inoculadas artificialmente, com incidências conhecidas do patógeno, não diferiram

entre si (Tabela 1). Porém, observou-se sensibilidade dos testes para detecção do patógeno, uma vez que houve relação entre a porcentagem da incidência na amostra e a detectada na semente, independentemente do método utilizado, sendo que à medida que se aumentou a incidência da amostra, verificou-se acréscimo no número de sementes detectadas com *S. sclerotiorum*. Estes resultados concordam com dados obtidos em trabalhos da literatura, que utilizaram a inoculação artificial da semente para observar a sensibilidade do método em detectar o fungo (Peres, 1996; Peres et al., 2002; Napoleão et al., 2006).

Segundo a Associação Internacional de Análise de Sementes (ISTA, 2007), responsável pela validação dos testes de sementes, a repetibilidade é um dos fatores importantes na aprovação de um procedimento, pois indica que na repetição do método os resultados serão semelhantes ou com variação tolerável.

Assim, analisando-se a repetibilidade dos resultados (Tabela 1), baseando-se no objetivo do teste de patologia de sementes, que é o de estimar o risco de disseminação para novas áreas (Machado, 2000), e no fato de que uma semente contaminada por *S. sclerotiorum* representa 2.000.000 focos de infecção (Steadman, 1983), a detecção de uma semente na amostra avaliada é relevante. Pelos dados obtidos, observou-se que os métodos foram eficientes na detecção do fungo *S. sclerotiorum* em sementes infectadas artificialmente.

A eficiência da sensibilidade dos métodos pode ser explicada pelo fato que nas sementes inoculadas artificialmente, o patógeno localiza-se principalmente no tegumento, facilitando o seu desenvolvimento nas condições de incubação empregadas nos testes de sanidade, uma vez que o fungo depende somente do ambiente favorável para se desenvolver.

Na Tabela 2 encontra-se a sensibilidade dos métodos de detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de várias cultivares de soja, oriundas de áreas nas quais foi monitorada a incidência da doença no campo. Pelos dados obtidos, foi detectada a presença do patógeno em porcentagens de: 3,0; 0,25 e 0,50 % (“Blotter Test” a 7 °C) para a amostra provenientes de área com 0,27 % de incidência da doença no campo; 0,75 % (“Blotter Test” a 20 °C) com incidência no campo de 5,6 %; 1,0 % (Rolo de Papel) com incidência no campo de 3,14 % e 0,25% (Neon-S) com incidência no campo de 0,27 %.

Apesar dos dados obtidos não diferirem estatisticamente, observou-se que os métodos aplicados para cada amostra não originaram resultados similares. Neste sentido, o método “Blotter Test” a 7 °C destacou-se na detecção do fungo para a amostra de sementes da cultivar NS 4823 RR, podendo ser considerado mais sensível do que os demais. Entretanto, ao analisar os resultados das amostras de outras cultivares, essa tendência não se confirmou.

Outro aspecto verificado foi a falta de repetibilidade dos dados, como revelado nos métodos de incubação “Blotter Test” a 20 °C, Rolo de Papel e Neon-S, que detectaram a presença do patógeno somente em uma das repetições. Notou-se, também, que uma das repetições dos métodos “Blotter Test” a 7 °C e Neon-S foram similares à incidência apresentada no campo, mas esta semelhança não foi verificada nas outras repetições dos referidos testes, bem como em nenhum outro método de detecção.

Observou-se, também, que não houve relação entre a incidência do fungo no campo e sua detecção na semente, como revelado na amostra da cultivar BR 295 RR, a qual apresentava maior incidência no campo (7,23%) e não houve detecção na semente. Deste modo, pode-se inferir que a sensibilidade dos métodos não detecta o patógeno em sementes de soja naturalmente infectada e não apresentam repetibilidade.

Morrison (1999) observando a heterogeneidade dos lotes de sementes de crucíferas, tomate e pimenta, principalmente quanto à sanidade, recomendou o aumento do número de sementes da amostra para o teste de patologia, com a finalidade de elevar a probabilidade de detecção de patógenos presentes na semente. No entanto, para a obtenção de uma amostra de trabalho representativa, é necessário o conhecimento do nível de infecção das sementes a serem analisadas, ou seja, o potencial de transmissão de uma planta infectada para a semente e a relação com a sensibilidade dos métodos de detecção (Dhingra, 2005; Barrocas & Machado, 2010).

Neste sentido, na Tabela 3 está apresentada a sensibilidade dos métodos de detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja, colhidas diretamente de plantas infectadas. Observou-se que, nas amostras da cultivar Don Mario 5.8i RR (talhão A, região de Arapoti) e Don Mario 5.8i RR (região de Pinhão), houve diferença estatística entre os métodos de detecção, sendo que o “Blotter Test” a 20 °C (safra 2009/10) e “Blotter Test” a 7 °C (safra 2010/11) detectaram a maior incidência do patógeno *S. sclerotiorum*. Analisando-se os dados obtidos para as outras cultivares, verificou-se que não houve consistência para considerar estes métodos mais sensíveis. Vale ressaltar que as sementes provenientes de plantas naturalmente infectadas, da cultivar A 4725 RR, não exibiram a presença do patógeno.

Esses dados mostraram que pode existir diferença na sensibilidade dos testes em relação a cultivar avaliada; porém, não se encontram dados na literatura sobre a suscetibilidade das cultivares de soja estudadas, para que se possa relacionar com a detecção na semente. A hipótese de que o ciclo da cultivar poderia influenciar a incidência do patógeno na semente, em função do maior período de floração, não pôde ser comprovada, uma vez que

a cultivar A 4725 RR tem ciclo superprecoce, semelhantemente a Don Mario 5,8i RR; porém, somente nesta última foi detectada a presença do patógeno nas sementes.

Pelo teste de Meio Neon-S não se detectou a presença de *S. sclerotiorum* em sementes provenientes de plantas naturalmente infectadas, para todas as cultivares. No entanto, seus resultados podem ter sido prejudicados pelos contaminantes, como os fungos *Rhizopus* sp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., que possivelmente ocultaram a presença de *S. sclerotiorum*.

Assim, a detecção do patógeno *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja depende, dentre outros fatores, do nível de infecção da semente, sendo que nas sementes com elevado nível de infecção (inoculadas artificialmente) os métodos apresentaram sensibilidade de detecção do patógeno e repetibilidade dos dados. Por outro lado, nas sementes provenientes de plantas naturalmente infectadas, a sensibilidade do método não detecta a presença do patógeno.

Os resultados obtidos podem ter sido consequência da infecção natural das sementes (maneira direta), a qual é realizada pelo contato da semente com as hifas do patógeno presentes nas vagens contaminadas. As hifas podem permanecer dormentes sobre o tegumento da semente e assim o patógeno pode ser detectado pelos métodos recomendados, uma vez que semelhante às sementes artificialmente inoculadas, as mesmas dependem também somente da condição ambiental para desenvolverem.

Por outro lado, a semente pode ser infectada naturalmente pelo patógeno *S. sclerotiorum*, apresentando baixo nível de infecção, não expressando assim a realidade do campo, pois necessita de maior período de incubação para seu desenvolvimento ou não há possibilidade de detecção pelos métodos estudados.

Considerando que uma semente pode formar mais de um escleródio, os quais podem permanecer no solo por mais de 11 anos viáveis e/ou germinarem e infestar uma área de produção de sementes (Bolton et al. 2006), há necessidade de pesquisas abordando a relação entre o potencial de transmissão de *S. sclerotiorum* da planta-mãe para as sementes e a sensibilidade dos métodos, para então se empregar a detecção do patógeno nas sementes de soja como um parâmetro para a tomada de decisão do controle da doença Mofo Branco.



## CONCLUSÕES

1. A sensibilidade os métodos não detectam os níveis de incidência do patógeno *S. sclerotiorum* em sementes de soja naturalmente infectadas;
2. Não se observou relação entre a incidência no campo do patógeno *S. sclerotiorum* e a verificada na semente de soja colhida;
3. Pelos métodos utilizados constatou-se que as sementes provenientes de plantas de soja infectadas por *S. sclerotiorum* no campo, não necessariamente estar transportando o patógeno.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA pelo apoio financeiro ao Projeto Edital 064/2008.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. /Secretaria de Defesa Agropecuária/Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009, 200p.

BARROCAS, E. N. & MACHADO, J. C. Associação e metodologia de detecção de vírus em sementes. **Informativo ABRATES**, v.20, n.3, p.76-77, 2010.

BILSEN, J.G.P.M. VAN; ASMA, M.; JONGELEEN, F.J.J.; KOENRAADT, H.M.S.; MEIJISING, W.D.; POOL, A.M.; VOGEL, R. DE; WOUTDT, L.P.; BULK, R.W. VAN DEN  
Seed transmission of Phoma lingam in vegetable brassicas and the effect of seed treatment. **Proceedings 3rd ISTA-PDC Seed Health Symposium**, International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland, pp. 10-18, 1999.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v.7, n.1, p.1-16, 2006.

Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x/full>> Acesso em: 05 jun. 2011. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2005.00316.X

CANTERI, M. G. ; ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. et al. SASM – Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott – Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

DHINGRA, O.D. Teoria da transmissão de patógeno fúngico por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p.75-112.

FEHR, W.R., CAVINESS, C.E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12p. (Special Report, 80).

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **ISTA Method Validation for seed testing**. –Switzerland, 2007. 70p.

Disponível em: <<http://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTAMethodValidationforSeedTesting-V1.01.pdf>> Acesso: 20 mar. 2011.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.; DEMARCH, V. B. e ROCHA, C. H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná: XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16, 2010, Brasília. **Resumos**: Brasília: EMBRAPA-SOJA, 2010. p 226-228.

KOCH, E.F.A.; MORAES, M.H.D.; MENTEN, E.J.O. Metodologia para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, Piracicaba, 1995. **Resumos**. Piracicaba: Grupo Paulista de Fitopatologia, 1995. p.18.

KOCH, E.F.A **Deteção, Incidência e efeitos de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão (*Phasolus vulgaris* L.)** 1998. 59p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

KOCH, E. F. A.; MENTEN, J. O. M. Método alternativo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v.26, n.2, p. 276-279, 2000.

LOBO JUNIOR, M. **Mofo Branco – *Sclerotinia sclerotiorum***. Bahia – Fundação BA. 2010. p.12-13. (Fundação BA. Boletim Passarela da Soja, Ano 02, n.2)

MACHADO, J.C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: Carvalho, N.M. e Nakagawa, J. (Eds.). **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP. 2000. p. 522-588.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-borne fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis**. Switzerland. International Seed Testing Association (ISTA), 2002. 138p.

MORRISON R. H. Sampling in Seed Health Testing. **Phytopathology**, v.89, p.1084-1087,

1999. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO.1999.89.11.1084>> Acesso em: 07 jun. 2011. DOI: 10.1094/PHYTO.1999.89.11.1084

NASSER, L.C.B.; ARANCIBIA, R.C.; NAPOLEÃO, R. Uso do meio Neon modificado para determinação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão produzidas em áreas irrigadas do cerrado. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, supl., p.309, 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052006000200014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052006000200014)> Acesso em: 05 jun. 2011. DOI.org/10.1590/S0100-54052006000200014

NAPOLEÃO, R.; NASSER, L.C.B.; LOPES, C.A.; CAFÉ FILHO, A.C. Neon-S, a new medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on seeds. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.2, p.180-182, 2006.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v32n2/v32n2a14.pdf>> Acesso em: 26 jun. 2011.

PARISI, J.J.D.; PATRÍCIO, F.R.A., OLIVEIRA, S.H.F. Modification of the paper towel seed health test for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.), **Summa Phytopathologica**, v.32, n.3, p.288-290, 2006.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v32n3/a15v32n3.pdf>> Acesso em: 20 jun. 2011.

PERES, A. P. **Detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e soja (*Glycine max* (L.) Merrill): desenvolvimento de metodologias.** Lavras, 1996. 51p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

PERES, A.P.; NASSER, L.C.B.; MACHADO, J.C. Use of semi-selective media for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on bean and soybean seeds. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n. 2, p.123-127, 2002.

SAHARAN, G.S., MEHTA, N. Economic importance. **In: Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management.** Springer, India, 2007. p.41-45.

SHEPPARD, J.W. Diagnostic sensitivity, especificity and predictive values in evaluation of new test. Methods. **In: Proceedings 1<sup>st</sup> ista plant disease committee symposium on seed health testing**. Ottawa, Canadá. 1993. p.132-142.

SILVA, G. C.; GOMES, D. P.; KRONKA, A. Z.; MORAES, M. H. Qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.29-34, 2008.

Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewArticle/2850>> Acesso em: 27 jul. 2011.

STEADMAN, J.R. White mold – a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, v.67, p.346-350, 1983.

STEADMAN, J.R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGE, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, p.68-70, 1994.

TAYLOR, E.; BATES, J.; JACCOUD, D. Diagnosis of Seedborne Pathogen. In: BASRA, A.S. (Ed.). **Handbook of Seed Science and Technology**. Binghamton:Food Product Press, 2006. p.649-675.

YANG, X.B., WORKENEH, F., LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. **Plant Disease**, v.82, p.264, 1998.

Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.1998.82.2.264B>> Acesso em: 15 maio 2011. DOI: 10.1094/PDIS.1998.82.2.264B

**Tabela 1** – Sensibilidade e repetibilidade dos métodos utilizados para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em amostras de sementes de soja inoculadas artificialmente, com incidências conhecidas do patógeno (safra 2008/09).

Métodos de detecção		Níveis de incidência em amostras de sementes contaminadas artificialmente																			
		0,00%				0,25%				0,50%				0,75%				1,0%			
		Repetibilidade dos resultados de cada método																			
		I*	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
“Blotter test”	7 °C	0 <sup>**</sup>	0	0	0	1 <sup>ns</sup>	1	1	1	2 <sup>ns</sup>	2	2	2	3 <sup>ns</sup>	3	3	3	4 <sup>ns</sup>	4	4	4
	14°C	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4
	20°C	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4
Rolode Papel 20 °C		0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4
Neon-S		0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	4

<sup>ns</sup> não significativo (p>0,05)

\*Repetibilidade: cada método repetido quatro vezes (I, II, III, IV), empregando-se 400 sementes por repetição.

\*\*Sensibilidade: número de sementes (incidência) com *S. sclerotiorum* por amostra contaminada

**Tabela 2** – Sensibilidade e repetibilidade dos métodos de detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em amostras de sementes de seis cultivares de soja, oriundas de áreas nas quais foi acompanhada a incidência no campo da doença (safra 2009/10).

		Incidência (%) no campo de <i>S. sclerotiorum</i> para cada cultivar					
Métodos de detecção		NS 4823RR (0,27 %)	BRS 242RR (0,97 %)	BRS 255RR (2,28 %)	Dom Mario 5.8i (3,14 %)	FTS CASCARELRR (5,6 %)	BR 295RR (7,23 %)
		Incidência (%) de <i>S. sclerotiorum</i> em sementes de soja					
“Blotter test” 7 °C		I*	3,00 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>
		II	0,25	0	0	0	0
		III	0	0	0	0	0
		IV	0,50	0	0	0	0
“Blotter test” 14 °C	R	I	0	0	0	0	0
	E	II	0	0	0	0	0
	P	III	0	0	0	0	0
	E	IV	0	0	0	0	0
“Blotter test” 20 °C	T	I	0	0	0	0	0
	I	II	0	0	0	0	0
	B	III	0	0	0	0	0
	I	IV	0	0	0	0,75	0
Rolo de Papel 20 °C	L	I	0	0	0	0	0
	I	II	0	0	0	1,00	0
	D	III	0	0	0	0	0
	A	IV	0	0	0	0	0
Neon-S	D	I	0	0	0	0	0
	E	II	0	0	0	0	0
		III	0	0	0	0	0
		IV	0,25	0	0	0	0

<sup>ns</sup> não significativo (p>0,05)

\*Repetibilidade: cada método repetido quatro vezes (I, II, III, IV), empregando-se 400 sementes por repetição.

\*\*Sensibilidade: incidência (%) de sementes com *S. sclerotiorum* por amostra.

**Tabela 3** – Sensibilidade dos métodos de detecção de *S. sclerotiorum* em amostras de sementes de soja, colhidas diretamente de plantas infectadas (safras 2009/10 e 2010/11).

Métodos de detecção	Incidência (%) de sementes com <i>S. sclerotiorum</i>				
	Região de Arapoti-PR Safrá 2009/10			Região de Pinhão-PR Safrá 2010/11	
	Don Mario 5.8i RR		SPRING RR	Don Mario 5.8i RR	A 4725RG
	Talhão A	Talhão B			
“Blotter test” 7°C	0,0* b	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	27* a	0 <sup>ns</sup>
“Blotter test” 14°C	29 a	16	6	11 ab	0
“Blotter test” 20°C	50 a	11	0	10 b	0
Rolo de Papel	3,0 b	2	9	0,25 b	0
Neon-S	0,0 b	0	0	0,00 b	0
CV (%)	44,28			51,66	

<sup>ns</sup> não significativo (p>0,05)

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey, a 1% de probabilidade



### 3 - CONCLUSÕES GERAIS

1. Verificou-se que a sensibilidade dos métodos avaliados não detectaram e nem possibilitaram a repetibilidade dos resultados para detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja provenientes de áreas com histórico da doença Mofo Branco;
2. Para amostras de sementes de soja inoculadas artificialmente, com elevado grau de incidência do fungo, todos os métodos testados foram sensíveis e possibilitaram a repetibilidade dos resultados para detecção de *S. sclerotiorum*;
3. O método de “Blotter Test” a 7 °C possibilitou a melhor inibição do desenvolvimento de outros fungos.
4. Os níveis de incidência do patógeno *S. sclerotiorum* em sementes de soja interferiram na sensibilidade dos métodos de detecção;
5. Não se observou relação entre a incidência no campo do patógeno *S. sclerotiorum* e a verificada na semente de soja colhida;
6. Pelos métodos utilizados constatou-se que as sementes provenientes de plantas de soja infectadas por *S. sclerotiorum* no campo, não necessariamente podem estar contaminadas pelo patógeno.
7. Os métodos recomendados para a detecção de *S. sclerotiorum* em sementes de soja necessitam ser adaptados para uso em laboratório de análise de rotina, salientando a importância do nível de infecção da semente e cuidados com a amostragem.

## REFERÊNCIAS

ANSELME, C.; CHAMPION, R. Bean anthracnose – *Phaseolus vulgaris*. *Colletotrichum lindemuthianum*, In: **ISTA Handbook in seed health testing**. Zeurich: Internacional Seed Testing Association (ISTA), 1981/982.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E COMERCIANTES DE SEMENTES E MUDAS DO RIO GRANDE DO SUL – APASSUL (2008) **Método citado para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em semente de soja.**

Disponível em: <<http://www.apassul.com.br/conteudo.asp?content=15&ea=detail&ID=42>>

Acesso em: 4 jan. 2010.

BALARDIN, C. R.; CELMER, A. F.; COSTA, E. C.; MENEGHETTI, R. C.; BALARDIN, R. S. Possibilidade de transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, através da semente. **Revista Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 574-581, 2005.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, British, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Manual de análise sanitária de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 200p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano Agrícola e Pecuário 2011-2012** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. – Brasília : Mapa/SPA, 2011. 92 p.

CARDOSO, E. J.B.N. Doenças da soja – Glycine max (L.) Merrill. In: CARDOSO, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças de Soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 569-588.

CARMONA, M., ZWEEGMAN, J. , REIS, E.M. Detection and transmission of *Drechslera avenae* from oat seed. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 3, p. 319-321, 2004.

CARREGAL, L.H.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. **Saiba mais sobre Mofo Branco**. 2005 Disponível em: <<http://www.ihara.com.br/index/ezsite.asp?ID=2065>> Acesso em: 5 ago. 2008.

CHOUDHURY, M. Situação atual e potencialidade de produção de sementes de alta qualidade sanitária em regiões árida e semi-áridas brasileiras. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol. 7, n.2, p. 21-32, 1985.

CONAB. Companhia Nacional de Safra Brasileira –. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento**, Brasília : Conab, 2011. 40 p. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_03\\_10\\_09\\_03\\_02\\_boletim\\_marco-11\[1\].pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_10_09_03_02_boletim_marco-11[1].pdf)> Acesso em: 8 out. 2011

COUTINHO, W.M.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, M.G.G.C.; GUIMARÃES,R.M.; FERREIRA, D.F. Uso da restrição hídrica na inibição ou retardamento da germinação de sementes de arroz de feijão submetidas ao teste de sanidade em meio Agar-água. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 23, n. 2, p. 127-135, 2001.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press,1995.

DHINGRA, O.D. Teoria da transmissão de patógeno fúngico por sementes. In: ZAMBOLIM, L. (ed.). **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 75-112.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2010 e 2011.- Londrina: Embrapa Soja: Embrapa Cerrados : Embrapa Agropecuária. Oeste, 2010.255p. (Sistemas de Produção / Embrapa Soja,ISSN 2176-2902; n.13). Disponível em:

< [http://www.cnpso.embrapa.br/download/Sistema\\_Producao14\\_VE.pdf](http://www.cnpso.embrapa.br/download/Sistema_Producao14_VE.pdf) > Acesso em: 8 out. 2011.

FARIAS, C.J.; DEL PONTE, E.M.; DAL MAGRO,T.; PIEROBOM, C.R. Inibição de germinação de sementes de trigo e milho em teste de sanidade em substrato de papel. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelota, v. 9, n. 2, p. 141-144, 2003.

FERREIRA, L.P.; LEHMAN, P.S.; ALMEIDA, A.M.R. **Doenças da soja no Brasil**. Londrina:EMBRAPA-CNPSO, 1979. 42p. (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 1)

FONTANA, J.A.; CAPELETTI, J.L.; KALSING, M.S.; MAZARO, S.M.; GOUVEA, A; MARI, L.F.; TARTARI, L.D.; LINK,L.; CAMINI,N.A.; ZANOTTI,J.; PAZINATTO,H.; RAMOS FILHO. J.B.; DONAZZOLO,J. Manejo de doenças na cultura da soja no sudoeste do Paraná na safra 2005/2006. **Synergismus scyentifica**, Pato Branco, v. 1, p. 150-155, 2006.

GOULART, A.C.P. Incidência e controle químico de fungos em sementes de soja em alguns municípios de Mato Grosso do Sul. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1467-1473, 2001.

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle**. Dourados: EMBRAPA AGROPECUARIA OESTE, 2005.

GRABICOSKI , E.M.; JACCOUD-FILHO, D.S.; HENNEBERG, L.; VRISMAN, C.M.; MANOSSO NETO, M.O. Potencial inibitório de extratos de plantas para *Sclerotinia*

*sclerotiorum*. In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA/ XLIII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN PHYTHOPATHOLOGICAL SOCIETY , 23, 2010, Cuiaba. **Resumo**. Brasília: Brazilian Phytopathological Society, 2010. v. 35, supl., p. 28.

HARTMAN, G. L.; KULL, L.; HUANG, Y. H. Occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean fields in east-central Illinois and enumeration of inocula in soybean seed lots. **Plant Disease**, v. 82, p. 560-564, 1998.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. (Ed.). **Compendium of soybean diseases**. 4<sup>th</sup> ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999.

HOFFMAN, D. D., HARTMAN, G. L., MUELLER, D.M., LEITZ, R. A., NICKELL, C. D., AND PEDERSEN, W. L.. Yield and seed quality of soybean cultivars infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 82, p. 826-829, 1998.

HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M., JACCOUD-FILHO, D. S.; PANOBIANCO, M. Eficiência de métodos para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em lotes de sementes comerciais de soja. RBS. **No prelo** 2012.

HENNING, A. A. **Patologia de sementes**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 2005. 52 p. (EMBRAPA-CNPSo – Documentos, 264)

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **ISTA Method Validation for seed testing**. –Switzerland, 2007. 70p.

Disponível em: <<http://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTAMethodValidationforSeedTesting-V1.01.pdf> >  
Acesso: 20 mar. 2011

JACCOUD-FILHO, D. S., VENANCIO, W. S., COLTURATO, A. B., HENNEBERG, L. Avaliação Sanitária de sementes de soja provenientes de plantas mortas por apodrecimento radicular. **Revista Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 120- 121, 2002.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.; DEMARCH, V. B. e ROCHA, C. H. Análise, Distribuição e Quantificação do “Mofo Branco” em Diferentes Regiões Produtoras do Estado do Paraná: XXXI REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 16, 2010, Brasília. **Resumos:** Brasília: EMBRAPA-SOJA, 2010, p. 226-228.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F.C. **Podridão Branca da haste de soja: Manejo e Uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção.** Uberlândia: Comoser, 2010.

JÚNIOR, M.L.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 2, p.521-526, 2000.

KOCH, E.F.A.; MENTEN, J.O.M. Método alternative para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 2. p. 276-279, 2000.

LEITE, R. M. V. B. C. **Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2005, p.1-3(Comunicado Técnico, 76).

MACHADO, J.C. **Patologia de sementes:** fundamentos e aplicações. Brasília: MEC, 1988.

MACHADO, J.C. Patologia de sementes: significado e atribuições. In: CARVALHO, N.M. E NAKAGAWA, J. (Eds.). **Sementes: ciência, tecnologia e produção.** Jaboticabal: FUNEP, 2000. p. 522-588.

MACHADO, J. C.; LANGERAK, C. J.; JACCOUD-FILHO, D. S. **Seed-borne fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis.** Switzerland: International Seed Testing

Association (ISTA). 2002.

MACHADO, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; VIEIRA, M.G.G.C; ALVES, M.C. Controle da germinação de sementes de soja em testes de sanidade pelo uso de restrição hídrica. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 2, p. 77-81, 2003.

MANOSSO NETO, M.O.; JACCOUD-FILHO, D.S.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G; PIERRE, M.L.C.; SARTORI, F.F. Análise, distribuição e quantificação do “Mofo Branco” (*Sclerotinia sclerotiorum*) em diferentes regiões produtoras do Estado do Paraná. In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA/ XLIII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN PHYTHOPATHOLOGICAL SOCIETY , 23, 2010, Cuiaba. **Resumo**. Brasília: Brazilian Phytopathological Society, 2010. v. 35, supl., p. 287a.

MANOSSO NETO, M.O.; JACCOUD-FILHO, D.S.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G; PIERRE, M.L.C.; SARTORI, F.F. Efeito de diferentes épocas de semeadura da cultura da soja e sua relação com a incidência do Mofo-Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA/ XLIII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN PHYTHOPATHOLOGICAL SOCIETY , 23, 2010, Cuiaba. **Resumo**. Brasília: Brazilian Phytopathological Society, 2010. v. 35, supl., p. 28b.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq., 2005.

MENEZES, J.R. Testes de sanidade de sementes de feijão. In: SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 395-405.

MENTEN, J.O.M Diagnóstico da patologia de sementes de girassol no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 7, nº 1, p. 25-30, 1985.

MENTEN, J. O. M. **Prejuízo causado por patógenos associados às sementes in Patógenos em sementes:** detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p.115-136.

MUELLER ,D. S.; HARTMAN, G. L.; PEDERSEN, W. L.,. Development of Sclerotia and Apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from Infected Soybean Seed and Its Control by Fungicide Seed Treatmet. **Plant Disease** , Illinois, v. 83, p. 1113-1115, 1999.

NAPOLEÃO, R.; NASSER, L.C.B.; LOPES, C.A.; CAF, FILHO, A.C. Neon-S, a new medium for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* on seeds. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 180-182, 2006.

NASSER, L.C.B.; BOLAND, G.J.; SUTTON, J.C. Meio semi-seletivo para detecção da viabilidade de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 20, supl., p. 376, 1995. (Resumo).

NASSER, L. C. B.; NAPOLEÇO, R.; CARVAJAL, R. A. Mofo branco - cuidado com a semente. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, São Paulo, n.4, mai.1999. Disponível em: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Helena/Meus%20documentos/CI%C3%A1udio%20-%20UEPG/Est%C3%A1gio/Sclerotinia/artigo.asp.html> Acesso em: 23 mai. 2008.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The MacMillan Press Ltd., 1979.

PARISI, J.J.D.; PATRÖCIO, F.R.A., OLIVEIRA, S.H.F. Modification of the paper towel seed health test for the detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 288-290, 2006.

PAULA, S. R. e FAVERET FILHO, P. F., **Panorama do Complexo soja**. Disponível em: (<http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set804.pdf>) Acesso: 4 jan. 2010.



PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M.S.B.; CARNEIRO, J. E. de S.; Mofo-Branco. In: DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. da. (Org.). **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010. p. 101-105.

PERES, A.P. **Deteção de Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary em sementes de feijão (Phaseolus vulgaris L.) e soja (Glycine Max (L.) Merrill: Desenvolvimento de Metodologia**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

REMUSKA, A.C.; DALLA PRIA, M. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. No crescimento de fungos fitopatogênicos. **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 3, p. 31-36, 2007.

RICHARDSON, M.J. **An Annotated List of Seed borne Diseases**. Supplement 1. Switzerland: Int. Seed Test. Assoc. Zurich, 1979.

RICHARDSON, M. J. **An annotated list of seed borne diseases**. 4. ed. Zürich: ISTA, 1990. 381 p.

ROESE, A.D.; ROMANI, R.D.; FURLANETTO, C.; STANGARLIN, J.R.; PORTZ, R.L. Levantamento de doenças na cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, em municípios da região Oeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Maringá**, Maringá, v. 23, n. 5, p. 1293-1297, 2001.

SAHARAN, G.S., MEHTA, **Sclerotinia Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management**. India: Springer, 2008.

SHEPPARD, J.W. Diagnostic sensitivity, especificity and predictive values in evaluation of new test. Methods. In: **PROCEEDINGS 1<sup>ST</sup> ISTA PLANT DISEASE COMMITTEE SYMPOSIUM ON SEED HEALTH TESTING**, 1993, Ottawa, Canada, p. 132-142.

SINCLAIR, J.B. Soybean seed pathology. In: YORINORI, J.T.; SINCLAIR, K.B.; MEHTA, Y.R.; MOHAN, S.K. **Seed pathology, problems and progress**. Londrina: IAPAR, 1979. p. 274.

SOAVE, J., M. M. V.S. WETZEL, E. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fund. Cargill, 1987.

SOMDA, I.; SANOU, J.; SANON, P. Seed-Borne Infection of Farmer-Saved Maize Seeds by Pathogenic Fungi and Their Transmission to Seedlings. **Plant Pathology Journal**. v. 7, n. 1, p. 98-103, 2008.

SUN, P. e YANG, X. B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, n. 12, p. 1287-129, 2000.

STEADMAN, J.R. White mold – a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, v. 67, p. 346-350, 1983.

STEADMAN, J.R.; MARCINKOWSKA, J.; RUTLEDGE, S. A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.16, p.68-70, 1994.

TAYLOR, E.J.; BATES, N.J.; JACCOUD FILHO, D. Diagnosis of seedborne pathogens. In: BASRA, A.S. **Handbook of Seed Science and Technology**. New York: Food Products Press, 2006. p. 649-675.

TORRES, J. P.; JÚNIOR, T. A.F. da S. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* in common bean seeds from the state of Paraná (Brazil). **Summa phytopathol**, v. 35, n. 2, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-540520090002000010](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-540520090002000010)> Acesso em: 25 set. 2011

TU, J.C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. **Journal of Phytopathology**, v. 121, n. 1, p. 40-50, 1988.

VIEIRA, R.F., PAULA JÚNIOR, T.J., PERES, A.P.; MACHADO, J.C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 770-773, 2001.

VRISMAN, C.M.; JACCOUD-FILHO, D.S.; MANOSSO NETO, M.O.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G; PIERRE, M.L.C.; SARTORI, F.F. Avaliação da eficácia de fungicidas e *Trichoderma* no controle do “Mofo Branco” (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA/ XLIII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN PHYTHOPATHOLOGICAL SOCIETY , 23, 2010, Cuiaba. **Resumo**. Brasília: Brazilian Phytopathological Society, 2010. v. 35, supl., p. 63.

WORKNEH, F., AND YANG, X. B.. Prevalence of *Sclerotinia* stem rot of soybeans in the north-central United States in relation to tillage, climate, and latitudinal positions. **Phytopathology**, v. 90, p. 1375-1382, 2000.  
24, 1996.

YANG,X. B., WORKENEH, F., and LUNDEEN, P. First report of sclerotium production by *Sclerotinia sclerotiorum* in soil on infected soybean seeds. **Plant Disease**, v.82, p.264, 1998.

YORINORI, J.T.; SINCLAIR, J.B.; MEHTA, Y.R. & MOHAN, S.K. **Seed pathology problems and progress**. Londrina: IAPAR, 1979.

YORINORI, J.J. e FEKSA, H. Importância da Podridão da soja (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: Reunião de Pesquisa da Soja Região Central do Brasil, 2001, Londrina-. **Resumo**. Londrina: EMBRAPA-SOJA, 2001. p. 119. (documento 157)

ZAMBOLIM, L. Teoria da transmissão de patógenos fúngicos por sementes. In:

ZAMBOLIM, L . **Sementes qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV;DFP, 2005. p. 75-112.